

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Composición química del aceite esencial de Tagetes  
elliptica Smith "Chincho" y determinación de su  
actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica**

**TESIS**

para optar al título profesional de Químico Farmacéutico

**AUTORAS**

Ingrid Karin Segovia Barrientos

Lucybel Lesly Suárez De la Cruz

**ASESOR**

Américo Jorge Castro Luna

**Lima – Perú**

**2010**

A mi familia por el apoyo brindado durante todos estos años, en especial a mi madre: Dina, mujer digna que me enseñó los valores de la responsabilidad, y la fortaleza; a ella todo mi amor, consideración y respeto eterno.

A mi tía Luz Haydee, que desde el cielo observa mi camino y que debe estar orgullosa de mis logros; siempre te tendré presente.

A todas las personas que me apoyaron moral y espiritualmente en mi formación humana y profesional; gracias por el apoyo y la confianza depositada.

A todas las personas que conocí en las aulas, la vida y en diferentes circunstancias; de todos ustedes aprendí a ser una mejor persona.

A todas las personas que dedican parte de su vida a la noble labor de la investigación en el campo científico; a ellos les debemos todo lo que sabemos de este mundo.

A todas las personas que luchan por sus sueños y arriesgan con inteligencia y mucha fe su tiempo a corto plazo con el objetivo de alcanzar un futuro mejor.

A la banda de rock irlandesa U2; cuyas canciones me acompañaron en la vida universitaria, en mis labores y en mi vida cotidiana, hoy forma parte de la banda sonora de mi vida.

A mi madre Dora mi gran  
tesoro gracias por ser mi  
guía e iluminar mi camino

A mis hermanos Boris y Marina, por  
su cariño y apoyo incondicional

A mi padre Estanislao gran inspiración,  
que Dios te guarde en su gloria, gracias por  
haber sido un gran ejemplo para tus hijos,  
sigues viviendo en mi corazón todos los días  
de mi vida.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Américo Castro por su apoyo y dedicación; al Q.F. Julio Ruiz Quiroz, por su incondicional y valioso apoyo, dedicación y amistad; y a la Mg. Q.F. Silvia Suárez Cunza por el apoyo prestado.

A los miembros del Jurado examinador y calificador: Presidenta: Dra. Q.F. María Elena Montoya Alfaro; miembros: Dr. Q.F. Mario Carhuapoma Yance; Mg. Q.F. María Elena Salazar Salvatierra; y Q.F. Delia Whu Whu.

## SUMARIO

Resumen	
Summary	
Introducción.....	1
I. Generalidades.....	3
1.1 Estudio del genero Tagetes.....	3
1.1.1 Clasificación taxonómica.....	3
1.2 Aceites esenciales.....	5
1.2.1 Definición.....	5
1.2.2 Extracción.....	5
1.2.3 Características fisicoquímicas de los aceites esenciales.....	6
1.2.3.1 Densidad Relativa.....	6
1.2.3.2 Índice de Refracción.....	6
1.2.3.3 Rotación Óptica.....	7
1.2.3.4 Índice de acidez.....	7
1.2.4 Composición química de los aceites esenciales.....	7
1.2.5 Actividad Antibacteriana y Antifúngica.....	10
1.2.6 Actividad antioxidante.....	13
II. Parte Experimental.....	17
2.1 Materiales y Equipos.....	17
2.1.1 Materiales.....	17
2.1.2 Equipos.....	17
2.1.3 Reactivos.....	18
2.1.4 Medios de cultivo.....	18
2.2 Material Biológico.....	18
2.3 Entidades donde se desarrolló la investigación.....	19
2.4 Preparación de la muestra.....	19
2.4.1 Recolección de la muestra.....	19
2.4.2 Extracción del Aceite esencial.....	19
2.5 Análisis Fisicoquímico del Aceite Esencial.....	20
2.5.1 Densidad Relativa.....	20
2.5.2 Índice de refracción.....	20
2.5.3 Rotación Óptica.....	20
2.5.4 Índice de acidez.....	20
2.6 Análisis por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas.....	22
2.6.1 Definición.....	22
2.6.1.1 Cromatografía de gases.....	22
2.6.1.2 Espectrometría de masas.....	22
2.6.1.3 Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas.....	22
2.6.2 Procedimiento.....	22
2.7 Determinación de la actividad Antibacteriana y Antifúngica por el método de difusión en agar y dilución en agar para el CMI.....	23
2.7.1 Método de difusión en Agar.....	23
2.7.1.1 Fundamento.....	23
2.7.1.2 Procedimiento.....	23
2.7.2 Método de dilución en Agar.....	25

2.7.2.1 Fundamento.....	25
2.7.2.2 Procedimiento.....	25
2.8 Determinación de la actividad Antioxidante.....	27
2.8.1 Captación del radical Libre Difenilpicrilhidrazilo (DPPH)....	27
2.8.1.1 Fundamento.....	27
2.8.1.2 Procedimiento.....	28
2.8.2 Captación del radical superóxido producido por pirogalol....	29
2.8.2.1 Fundamento.....	29
2.8.2.2 Procedimiento.....	29
III. Resultados.....	31
3.1 Análisis Fisicoquímico del Aceite esencial.....	31
3.1.1 Rendimiento.....	31
3.1.2 Características Organolépticas del Aceite esencial de <i>Tagetes elliptica Smith</i> .....	31
3.1.3 Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial.....	31
3.2 Análisis por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas...32	
3.2.1 Composición química del aceite esencial de <i>Tagetes elliptica Smith</i> .....	32
3.2.2 Estructura química de los componentes Del aceite esencial de <i>Tagetes elliptica Smith</i> .....	33
3.3 Determinación de la actividad Antibacteriana y Antifúngica.....	38
3.3.1 Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Tagetes elliptica Smith</i> .....	38
3.3.2 Actividad antifúngica del aceite esencial de <i>Tagetes elliptica Smith</i> .....	38
3.3.3 Concentración mínima inhibitoria.....	39
3.4 Determinación de la actividad Antioxidante.....	39
3.4.1 Captación del radical difenilpicrilhidrazilo.....	39
3.4.2 Captación del radical superóxido producido por pirogalol....	41
IV. Discusión.....	42
V. Conclusiones.....	47
VI. Recomendaciones.....	48
VII. Referencias Bibliográficas.....	49

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por finalidad determinar los componentes químicos cualitativamente, así como la actividad antibacteriana, antifúngica y antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Tagetes elliptica* Smith “chincho” obtenido de la Provincia de Huaraz, Región Ancash. El cual se obtuvo por el método de destilación por arrastre de vapor de agua; posteriormente fue sometido a un análisis Fisicoquímico, así como a la determinación de su composición química por medio del Espectrómetro de masas acoplado a un Cromatógrafo de gases (EM/CG). Por el método de difusión en agar y dilución en agar se determinó la actividad antimicrobiana y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) respectivamente, frente a los siguientes microorganismos: *S. aureus* ATCC 25933, *S. epidermidis* (cepa clínica), *B. subtilis* (cepa ambiental), *E. coli* (cepa clínica), *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella* (cepa clínica) y *C. albicans* ATCC 10231. De las pruebas realizadas, el aceite esencial mostró actividad antibacteriana frente a 5 cepas bacterianas, mostrándose *Klebsiella* resistente debido a que presentó un halo de inhibición < de 18 mm; en relación a *Candida albicans* ATCC 10231, el aceite demostró actividad antifúngica significativa. La CMI del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith que presentó actividad frente a *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* fue de  $7.62 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$ ; para *S. epidermidis* fue de  $97.5 \mu\text{g/mL}$ ; para *B. subtilis* fue de  $390 \mu\text{g/mL}$ ; y para *C. albicans* fue de  $780 \mu\text{g/mL}$ . Respecto a la actividad antioxidante, se realizaron dos pruebas de captación de radicales libres denominadas: Captación del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH) y Captación del radical superóxido producido por Pirogalol; obteniéndose los siguientes resultados:  $\text{IC}_{50}=975\mu\text{g/mL}$  e  $\text{IC}_{50}= 47.5 \mu\text{g/mL}$  respectivamente; los cuales no fueron significativos, teniendo en cuenta a los patrones de Trolox y Vitamina C respectivamente.

**Palabras Clave:** *Tagetes elliptica*, aceite esencial, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante.

## SUMMARY

The current monography have been purposed to determine chemical compounds by qualitative tests, as well as Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of *Tagetes elliptica* Smith “chincho” leaves essential oil, from Huaraz, Ancash Department. The *Tagetes elliptica* Smith “chincho” leaves essential oil was obtained by Steam distillation. These essential oils were undergone to Physical-Chemistry analyses, as well as a Spectrophotometry Test by Mass Spectrometry joint to Gas Chromatography. By means of Agar diffusion method and Agar dilution method, antimicrobial activity and Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined respectively, against the following microorganisms: *S. aureus* ATCC 25933, *S. epidermidis* (clinical strain), *B. subtilis* (environmental strain), *E. coli* (clinical strain), *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella* (clinical strain) y *C. albicans* ATCC 10231. From conducted assays, the essential oil showed an antibacterial activity against 5 strains, *Klebsiella* showed resistance in front of essential oil, due to present an inhibition zone < 18 mm. In *Candida albicans* ATCC 10231, the essential oil showed a significant antifungal activity. Minimum inhibitory concentration of *Tagetes elliptica* Smith essential oil, which has showed consistent activity against *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* was  $7.62 \times 10^{-1} \mu\text{g/mL}$ ; *S. epidermidis* was  $97.5 \mu\text{g/mL}$ ; *B. subtilis* was  $390 \mu\text{g/mL}$ ; and *C. albicans* was  $780 \mu\text{g/mL}$ . For Antioxidant activity, Two free radicals scavenging assays have been performed: DPPH activity and Superoxid radical activity; detting the following results:  $\text{IC}_{50}=975\mu\text{g/mL}$  and  $\text{IC}_{50}= 47.5 \mu\text{g/mL}$ , respectively; which have not been significant, considering Trolox and Vitamin C standards, respectively.

**Key Word:** *Tagetes elliptica*, essential oils, antimicrobial activity, antioxidant activity.



# INTRODUCCIÓN

Perú posee una rica variedad en especies vegetales, debido a las condiciones geográficas favorables la presencia de la Cordillera de los Andes, la existencia de tres regiones geográficas y la diversidad de pisos ecológicos; conjugando una sinfonía florística peculiar por cada departamento. **(1)**

Con respecto a la región Ancash, entre la flora más representativa tenemos la Puya Raimondi, y otras plantas propias de la región como los árboles de quisuar, queñoa e ichu; igualmente, se han identificado más de 850 especies de flora, que conforman diferentes asociaciones de humedales, pastizales, matorrales y bosques; destacando entre ellas las especies arbóreas del género *Polylepis*, *Gynoxys*, *Buddleja* y *Alnus*. Destaca también la variedad de orquídeas y flora medicinal, además, de especies de importancia como recurso genético, entre las que tenemos a *Oxalis sp.* (oca silvestre), *Solanum sp.* (papa silvestre) *Lupinus sp.* (chocho silvestre) etc. **(2)**

La medicina tradicional, en los últimos años ha cobrado importancia como una terapia alternativa al uso de medicamentos sintéticos producidos en la industria farmacéutica, y cabe destacar el uso de plantas medicinales, de cuyas hojas, frutos, tallos y raíz se obtienen metabolitos activos por medio de extractos alcohólicos, acuosos; destilación o cocción. **(3)**

Los aceites esenciales son una compleja mezcla natural de metabolitos secundarios volátiles, aislados de plantas mediante métodos como: destilación, extracción con solventes, etc. Los principales constituyentes de los aceites esenciales son mono y sesquiterpenos, incluyendo carbohidratos, éteres, aldehídos y cetonas, los que son responsables de la fragancia y propiedades biológicas de las plantas medicinales. Los aceites esenciales cubren un amplio espectro de actividades farmacológicas, demostrando propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas. Otras cumplen actividad biocida contra una variedad de organismos como bacterias, hongos, virus, protozoos, insectos y plantas. Durante mucho tiempo han sido utilizados

en el campo de la cosmética, en la elaboración de perfumes, la conservación de alimentos y aromaterapia. **(3, 4, 5, 6, 7)**

El uso de *T. elliptica Smith* “chincho” se debe a su agradable aroma en potajes locales como pachamancas, algunos aderezos, y como paliativo en el síndrome menstrual. Gran parte de su utilización proviene de su contenido de aceites esenciales, los cuales le brindan el aroma característico. El siguiente estudio pretende determinar la composición química, la actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *T. elliptica Smith*; debido a hipótesis e investigaciones anteriores realizadas sobre aceites esenciales y su potencial efecto antioxidante, antibacteriano y antifúngico; brindar información para futuros estudios y aplicaciones de la mencionada especie; y así aprovechar nuestros recursos naturales como alternativa de salud frente a los antibióticos convencionales y a los antioxidantes artificiales, cuyos efectos secundarios han producido diversos problemas en pacientes y consumidores, como resistencia bacteriana, reacciones adversas y predisposición a enfermedades oncológicas. **(8, 9)**

Los objetivos de la presente investigación fueron:

Obtención del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*.

Determinación de los componentes químicos, actividad antioxidante, actividad antibacteriana y antifúngica de *Tagetes elliptica Smith*.

# I. GENERALIDADES

## 1.1 Estudio del género *Tagetes*

### 1.1.1 Clasificación taxonómica:

División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Subfamilia:	Asteroideae
Tribu:	Tageteae
Genero:	<i>Tagetes</i>
Especie:	<i>Tagetes elliptica</i> Smith

El género *Tagetes*, perteneciente a la tribu *Tageteae* que contiene a 16 géneros, corresponde a la familia de las *Asteraceae*. Este mismo género comprende 56 especies netamente aromáticas, las cuales crecen cultivadas o silvestres, son nativas de América y muy pocas de ellas son adventicias en el Viejo Continente. Algunas de ellas se cultivan como ornamentales, y se les conoce como “virreinas” o como “marigold”; y otras se han adaptado bien a la horticultura, existiendo antecedentes de su cultivo y uso extendido.

El nombre de *Tagetes*, originalmente fue aplicado por el filósofo Apuleus (siglo II), ello en honor al bello dios etrusco Tages, ello en alusión a la hermosura de las flores; nombre que posteriormente fue adoptado por Leonhartus Fuchius en su libro “*Historia Stirpium*” en el siglo XVI. **(10, 11)**

Este género comprende cerca de 60 especies entre ellas la especie botánica en estudio en el presente trabajo: *Tagetes elliptica* Smith, además de: *Tagetes erecta*, *Tagetes minuta*, *Tagetes pusilla*, *Tagetes lucida*, *Tagetes patula*, y *Tagetes terniflora*, entre las más destacables debido a sus usos como alimento, condimento, en la extracción de pigmentos, en la medicina tradicional y antagonista de nemátodos fitoparásitos. **(12, 13)**

*Tagetes elliptica* Smith, conocida como “chincho”, “chinchu” o “chikchimpa” es utilizado como alimento y condimento en ajíes, guisos, asados y pachamancas; y en la medicina tradicional, sus hojas son utilizadas en infusiones, para la dismenorrea. **(14)**

Respecto a su potencial actividad biológica en cuanto a los estudios realizados en torno a este género destacan:

En el año 2004 Felice Senatore y colaboradores mostraron la existencia de actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Tagetes minuta* (huacatay) contra las bacterias evaluadas, con valores de CMI de 6.25 – 25 µg/ml para bacterias Gram positivas y de 25- 50 µg/ml para bacterias Gram negativas. Así mismo, se reportó que los niveles de dihidrotagetonas, tagetonas, y ocimenonas encontrados en dicha planta podrían tener relación en la actividad antimicrobiana observada. Otros reportes muestran que el extracto de hojas de *Tagetes lucida* presenta actividad contra bacterias Gram positivas. **(15)**

Pineda Castillo y colaboradores mostraron que el extracto etanólico de hojas de *Tagetes elliptica* L. (chincho) mostró actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium*, con valores de CMI de 3125 µg/ml. **(16)**

En un estudio realizado por Tereschuk (2005), los flavonoides mayoritarios del género *Tagetes* extraídos de hojas y flores de *T. minuta*, *T. pusilla* y *T. terniflora* fueron agliconas como patuletina, quercetina, quercetagetina, iso-ramnetina. Se trató de esclarecer el mecanismo de acción, como antimicrobiano, del flavonol quercetagetina, una de las agliconas más ampliamente distribuida en el género *Tagetes*, atribuyéndosele una potente actividad inhibitoria frente a todas las enzimas eucarióticas ADN polimerasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y ADN polimerasa I de *E. coli*, así como frente a la enzima ARN polimerasa. La actividad biológica de los flavonoides fue sugerida por primera vez por el premio Nóbel Szent-Gyorgyi (1938) quien reportó que los flavonoides de la cáscara de los *Citrus* resultaban efectivos en la prevención de la fragilidad capilar y el sangrado asociados con el escorbuto y los llamó “vitamina P”. **(11)**

Se reportaron resultados que permiten validar el uso popular de *Tagetes pusilla* anís serrano en el tratamiento de afecciones intestinales como, salmonelosis y el cólera. Respecto a la levadura oportunista *Candida albicans*, se reportó que dicho aceite esencial ejerció un efecto similar al del micostatin (único antimicótico al que fue sensible). **(17)**

Se reportaron propiedades antifúngicas del aceite esencial de *Tagetes patula* identificándose treinta componentes representando el 89.1% del total detectados, la mayoría de los componentes encontrados fueron piperitona, piperitenona, terpinoleno, dihidro tagetona, *cis*-tagetona, limoneno, y el *o*-ocimeno. El aceite ejerció actividad antifúngica contra dos hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*, produciendo completa inhibición del crecimiento en ambos hongos. **(18)**

## **1.2 Aceites esenciales**

### **1.2.1 Definición:**

Los aceites esenciales son mezclas de sustancias líquidas volátiles obtenidas de plantas, que presentan como características principales su compleja composición química y su carácter fuertemente aromático.

Dado que los aceites esenciales se encuentran en concentraciones mínimas en la planta, generalmente son difíciles de obtener, para lo cual es necesario contar con gran cantidad de material vegetal. **(19, 20)**

### **1.2.2 Extracción:**

Los diferentes procesos de extracción utilizados en la obtención de aceites esenciales comprenden métodos como: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes y con fluidos supercríticos como se indica en la siguiente tabla 1:

**Tabla 1. Métodos de extracción de los aceites esenciales**

METODO	PROCEDIMIENTO		PRODUCTOS OBTENIDOS
MÉTODOS DIRECTOS	EXPRESION	COMPRESIÓN DE CÁSCARAS	ACEITES ESENCIALES CÍTRICOS
		RASPADO DE CASCARAS	
	EXUDADO	LESIONES MECÁNICAS EN CORTEZAS	AROMAS RESINAS BÁLSAMOS
DESTILACIÓN	DIRECTA		ACEITES ESENCIALES Y AGUAS AROMÁTICAS
	POR ARRASTRE CON VAPOR (DIRECTO, INDIRECTO, A PRESIÓN, AL VACÍO)		
	DESTILACIÓN-MACERACIÓN (LIBERACIÓN ENZIMÁTICA DE AGLICONAS EN AGUA CALIENTE)		ALMENDRAS. MOSTAZA, AJO, HOJAS DE ABEDUL
Procesos de extracción con fluidos en condiciones subcríticas y supercríticas			

*Ref. Shiva RC. Estudio de la Actividad Antimicrobiana de Extractos Naturales y Ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento (tesis doctoral).*

### **1.2.3 Características físicoquímicas de los aceites esenciales:**

#### **1.2.3.1 Densidad Relativa:**

La densidad se define como la masa de un sistema (m) dividida por el volumen del mismo (v) a una temperatura y presión determinadas. La densidad relativa es la relación entre la densidad de un sistema y la densidad de un sistema de referencia en condiciones especificadas para ambos sistemas. La Picnometría es una técnica de referencia para la medición de la densidad en líquidos. **(21)**

#### **1.2.3.2 Índice de Refracción:**

Es la relación (n) entre la velocidad de la luz en el espacio y la velocidad de la luz en un medio determinado (también expresado como los senos de los ángulos de incidencia y de refracción); y esta relación tiende a disminuir ligeramente cuando aumenta el peso molecular. Si la radiación incidente pasa de un medio menos denso, n será menor que 1. La refractometría es la técnica que mide directamente el índice de refracción. **(22, 23, 24)**

### **1.2.3.3 Rotación Óptica:**

La rotación óptica es la rotación de un plano de polarización de un haz de luz polarizada plana por una sustancia ópticamente activa; viene dada por un ángulo  $\alpha$ , que forman los planos de polarización del haz incidente y el haz emergente en la sustancia, denominado ángulo de rotación óptica. Para expresar los datos de rotación óptica en una forma lógica, para establecer comparaciones, hay que escoger condiciones estándar. La polarimetría mide el ángulo de rotación del plano de vibración de la luz polarizada, cuando esta atraviesa un medio que contiene una sustancia ópticamente activa. Para ello se utiliza el polarímetro. (22, 25)

### **1.2.3.4 Índice de acidez:**

El índice de acidez es una medida del grado de descomposición del aceite o de la grasa, por acción de las lipasas o por alguna otra causa. El índice de Acidez de un aceite o de una grasa, se define como el número de miligramos de hidróxido de sodio (o potasio) requeridos para neutralizar la acidez libre por gramo de muestra; aunque a veces también se expresa como el porcentaje de ácido oleico presente en la muestra. (26)

### **1.2.4 Composición química de los aceites esenciales:**

Desde el punto de vista químico, los aceites esenciales provenientes de las plantas están formados principalmente por mezclas de compuestos llamados terpenos (pequeñas moléculas orgánicas con una enorme diversidad de estructuras). Se conocen miles de terpenos diferentes, y muchos tienen enlaces dobles carbono-carbono. Algunos son hidrocarburos y otros contienen oxígeno; algunos son moléculas de cadena abierta y otros contienen anillos. Las moléculas con menor número de carbono son las más volátiles, pero no hidrosolubles, sobre todo si poseen un átomo de oxígeno, ellas quedan en el hidrolato aromático (agua de destilación), por el contrario, un elevado número de carbonos hace que sean poco volátiles y generalmente forman resinas. Los compuestos más importantes luego de la destilación son: terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos. (27, 28)

Todos los terpenos están relacionados, sin importar sus aparentes diferencias estructurales. De acuerdo con el formalismo denominado regla del isopreno, se considera que los terpenos surgen de la unión de la cabeza a la cola de unidades de isopreno de cinco carbonos (2-metil-1,3 butadieno), el carbono 1 es la cabeza de la unidad de isopreno y el 4 es la cola. **(27)**

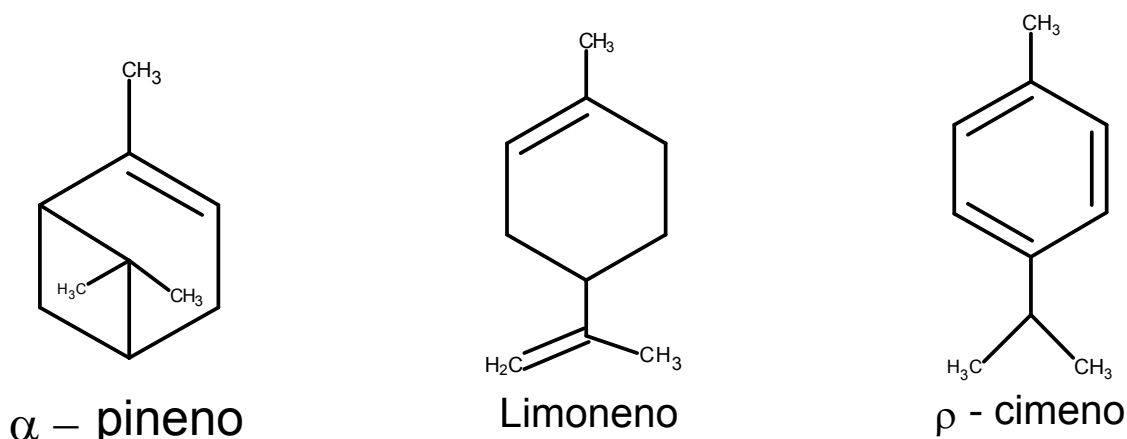
Todas las moléculas encontradas en los aceites esenciales extraídos por el arrastre de vapor de agua están constituidas por moléculas cuya estructura base esta formada por una cadena carbonada de entre 7-20 átomos de carbono, hidrogeno y oxigeno. Los más comunes son los de C<sub>10</sub> (monoterpenos).

### **Serie de los terpenos**

Están compuestos por hidrogeno y carbono. Se presentan como polímeros del isopreno. Los grupos que más se destacan son:

### ***Los monoterpenos***

Es la más pequeña, ya que esta formada como máximo por C<sub>10</sub> – H<sub>15</sub>. Son hidrocarburos alicíclicos, monocíclicos, bicíclicos, o policíclicos. Van acompañados de sus derivados oxigenados: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y las estructuras mas representativas son: p-cimeno, β-terpineol, isopulegol, s-careno-3, verbenona, tuyona, limoneno, isofenchona, crisantenona, borneol, α-pineno, nerol, mentol, eucaliptol, etc.



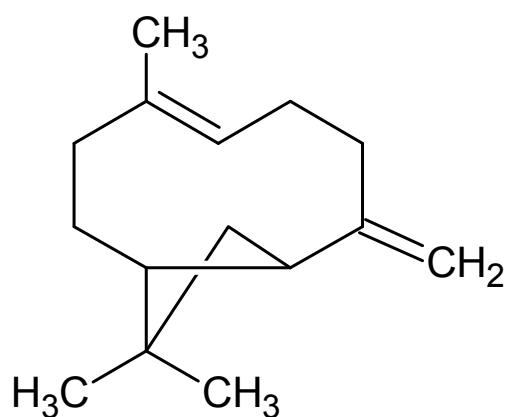
Ref. Romero MD. Plantas Aromáticas: Tratado de Aromaterapia Científica

**Figura 1. Estructura química de algunos Monoterpenos**

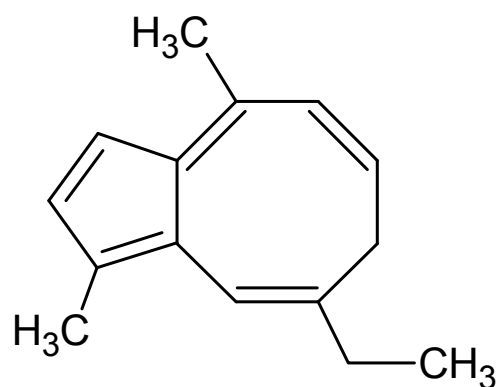


### Los sesquiterpenos

Formados por quince carbonos ( $C_{15}$ ); al aumentar el número de ciclaciones y de modificaciones hacen que aparezcan millares de compuestos relacionados con una centena de esqueletos carbonados como el:  $\alpha$ -zingibereno, alcohol del pachulí,  $\alpha$ -cisbergamoteno, longifoleno, camazuleno,  $\beta$ -cariofileno, nerolidol, carotol, viridiferol, etc.



**$\beta$  – cariofileno**



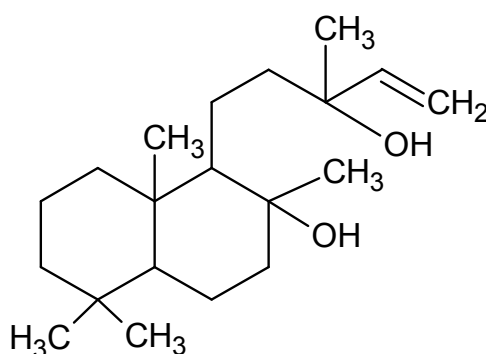
**Camazuleno**

Ref. Romero MD. Plantas Aromáticas: Tratado de Aromaterapia Científica

**Figura 2. Estructura química de algunos Sesquiterpenos**

### Los diterpenos

Son los que contienen más de 20 carbonos ( $C_{20}$ ). El más abundante es el esclareol. Los terpenos de 30 – 40 carbonos existen en plantas, pero no en los aceites esenciales. **(28)**



**Esclareol**

Ref. Romero MD. Plantas Aromáticas: Tratado de Aromaterapia Científica

**Figura 3. Estructura química de un diterpeno**

### **1.2.5 Actividad Antibacteriana y Antifúngica:**

A pesar del desarrollo de antibióticos, las infecciones bacterianas y fúngicas aun constituyen un mayor problema en medicina, y la presencia de numerosas cepas resistentes suponen un nuevo reto. La medicina natural ha sido utilizada en este campo de manera extensa durante siglos; y recientemente un creciente interés en los productos naturales se ha estado dando y ello debido a su disponibilidad, bajos efectos adversos o toxicidad así como una mejor biodegradabilidad en comparación con la disponibilidad de antibióticos y preservantes. De esta manera, los aceites esenciales de algunas plantas ofrecen un gran potencial y esperanza. **(4)**

Generalmente los aceites esenciales poseen evidentes propiedades antimicrobianas, sin embargo, su mecanismo de acción aún no está definido, esto debido a su complejidad, aunque se reconoce que la acción antimicrobiana de los aceites esenciales depende de su carácter hidrofílico o lipofílico. Los terpenoides sirven como un ejemplo de agentes liposolubles que afectan la actividad de las enzimas catalizadoras de membrana, por ejemplo su acción en la respiración microbiana. Teniendo en cuenta la gran variedad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales, es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos en distintas zonas de la célula. Ciertos componentes de los aceites esenciales pueden actuar como “desacopladores”, que interfieren con la translocación del protón sobre la membrana de una vesícula y subsecuentemente interrumpen la fosforilación del ADP (metabolismo de energía primaria). Terpenoides específicos con grupos funcionales, como alcoholes fenólicos o aldehídos, también interfieren en las proteínas enzimáticas integradas a la membrana o asociadas, deteniendo su producción o actividad. **(4, 29)**

Los aceites esenciales son en general ligeramente más activos frente a bacterias Gram positivas que frente a las Gram negativas. Esto puede deberse a la estructura de la pared celular y la composición de la membrana externa de las bacterias y su interacción con los aceites esenciales, de naturaleza lipofílica. En el caso de las bacterias Gram negativas sensibles, así como de

las Gram positivas, los aceites esenciales se introducen a través de los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, alterando su estructura y haciéndolas más permeables, y como consecuencia tiene lugar una fuga de iones y de otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa, que puede llevar a la muerte celular. **(29)**

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios realizados sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se han centrado en microorganismos patógenos para el hombre, así como en aquellos presentes en los alimentos, bien por su implicación en infecciones alimentarias tóxicas, o por su capacidad para alterar las propiedades de los alimentos. **(29)**

Se ha reportado que la estructura de la pared celular y la membrana externa de los microorganismos determinan el modo de acción de los agentes antimicrobianos; por ejemplo las bacterias Gram negativas, como la *P. aeruginosa*, muestran una resistencia intrínseca a una amplia variedad de aceites esenciales, lo cual está asociado con la superficie hidrofílica de su membrana externa, rica en moléculas de lipopolisacáridos. Pequeñas moléculas hidrofílicas no son prevenidas de pasar a través de la membrana externa debido a una acción de las proteínas llamadas porinas. Sin embargo, las macromoléculas hidrofóbicas, como los constituyentes de los aceites esenciales, son incapaces de penetrar la barrera. Se reportó que la efectividad de los agentes antibacterianos aumenta generalmente con sus propiedades lipofílicas como resultado de la acción en las membranas bacterianas. Por otro lado, los aceites esenciales usualmente expresan una menor solubilidad acuosa, lo cual previene a las bacterias de alcanzar niveles tóxicos en las citomembranas. Algunos componentes de los aceites que son de naturaleza fenólica, como el carvacrol y el timol, provocan una interrupción de la capa externa de lipopolisacáridos seguida de una desintegración parcial de la membrana externa. **(4)**

Algunos aceites, como el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* usado contra *E. coli*, actúan como desinfectantes activos provocando la desnaturalización de las proteínas de la membrana bacteriana, produciendo una interrupción en la membrana externa, con consecuente pérdida de iones potasio (K<sup>+</sup>), inhibición de la respiración y lisis celular. El efecto de la acción del aceite puede ser observado en el microscopio como una coagulación en el citoplasma y ruptura de la pared celular. **(4)**

Los componentes del aceite esencial destruyen la pared celular y la membrana citoplasmática de las bacterias y hongos, produciendo un escape de citoplasma y su coagulación. Signos visibles de la acción del aceite contra los hongos puede observarse por los cambios morfológicos en sus colonias tanto microscópicamente como a simple vista. Por ejemplo, eugenol y carvacrol causan cambios morfológicos en los mohos como el *Cladosporium herbarum* que al ser tratados con los componentes mencionados, su suave y elástico micelio es traumatizado y se vuelve frágil, con protuberancias similares a vesículas; se observan un aumento en la ruptura de hifas, variación en su diámetro y disminución del número de conidias. Las deformaciones morfológicas podrían estar relacionadas a la acción del eugenol y carvacrol sobre algunas enzimas de la pared celular tales como las quitinasas y las glucanasas.

La velocidad de crecimiento de las bacterias Gram positivas como *S. aureus* disminuye aun a concentraciones bajas del sesquiterpeno  $\tau$ -cadinol, probablemente debido a una interacción con el metabolismo de energía primaria, a una alta concentración (50ug/mL) provoca la desintegración de la envoltura celular del *S. aureus* y una pérdida del citoplasma. En algunos hongos y otras bacterias Gram positivas, que son sensibles al imidazol y cuyas membranas celulares son ricas en ácidos grasos insaturados, un reordenamiento de los constituyentes de la membrana provoca una pérdida de la viabilidad celular y eventualmente lisis. Los aceites esenciales también inhiben la síntesis de DNA, RNA, proteínas y polisacáridos en las células bacterianas y fúngicas. En los hongos, provoca cambios similares a los efectos de la acción de los antibióticos. **(4)**

Generalmente, los aceites esenciales que poseen notables propiedades antimicrobianas, contienen un alto porcentaje de compuestos fenólicos como el carvacrol, el timol y el eugenol. El carvacrol (componente mayoritario del orégano) y el timol (procedente del tomillo) son capaces, dependiendo de la concentración de inclusión, de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Así mismo se ha reportado que derivados fenólicos tales como carvacrol y eugenol provenientes del clavo de olor y tomillo causan la desintegración de la membrana de *E. coli* y *S. typhimurium*. El eugenol, (componente mayoritario del aceite de clavo de olor), y el cinamaldehído (componente de la canela) actúan inhibiendo la producción de enzimas intracelulares, tales como amilasas y proteasas, lo que provoca el deterioro de la pared y un alto grado de lisis celular. En otros estudios se demostró la actividad de aceites esenciales contra *Salmonella*, con lo que luego se dedujo que los aceites esenciales con actividad fueron los de canela, clavo de olor, orégano y tomillo. **(29)**

#### **1.2.6 Actividad antioxidante:**

##### **Radicales Libres (RL):**

Se consideran Radicales Libres a aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Es una entidad química que a diferencia de la normal tendencia de los electrones localizados en los átomos y moléculas a la formación de pareja es desapareado. Esto lo hace muy inestable, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos. **(30)**

El oxígeno molecular, vital para la existencia de los organismos aerobios, es inherentemente tóxico. Esta paradoja deriva de la misma naturaleza química del oxígeno. El lado perjudicial del oxígeno se relaciona directamente con el hecho de que cada átomo de oxígeno posee un electrón desapareado en su orbital externo y la molécula de oxígeno posee dos electrones desapareados

en dos orbitales distintos, de manera que el átomo de oxígeno es un radical libre y la molécula de oxígeno un biradical libre. La reducción tetravalente concertada del oxígeno por la cadena de transporte electrónica mitocondrial para producir agua, se considera un proceso relativamente seguro; sin embargo, el ambiente reducido del medio intracelular proporciona amplias oportunidades para que el oxígeno sufra la reducción univalente que es la causante de la generación de los intermediarios reactivos. El radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo son los subproductos de esta reducción univalente, denominados especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species, ROS) y responsables de la toxicidad del oxígeno. (31)

En el año 2000 Bello, establece que el peligro más importante que acecha a una célula proviene de las moléculas oxidantes, entre las que destacan los radicales libres, los cuales son generados por diversos factores intrínsecos, como las actividades de algunas enzimas (oxidasas, deshidrogenadas y peroxidasas) o la autooxidación de los lípidos; y por fuentes externas, tales como los disolventes orgánicos, el humo del tabaco, los pesticidas, algunos poluentes (ozono), radiaciones, etc. Como resultante de todo ello, aparecen radicales de diversa naturaleza (alcoil, hidroxil, hipoclorito, oxígeno singlete, peroxi, superóxido y peróxido de hidrógeno). Los radicales libres suelen ser extraordinariamente dañinos para los sistemas biológicos y, desde luego, significan un peligro para una gran variedad de moléculas: ácidos nucleicos, enzimas que contienen iones metálicos de transición, proteínas que incluyen grupos SH, lípidos de membranas, etc. Se sospecha que los radicales libres y otras moléculas oxidativas están implicadas en la patología de numerosas situaciones clínicas: aterosclerosis, cáncer, cataratas, diabetes, etc. Incluso mucho de los desórdenes degenerativos se relacionan con el desequilibrio entre las fuerzas oxidantes y reductoras que pueden desembocar en modificaciones oxidativas de las proteínas y otros compuestos esenciales. (32)

### ***Antioxidante:***

Halliwell define como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable

(biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante al colisionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico y que en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los RL. Los antioxidantes se clasifican en: exógenos o antioxidantes que ingresan a través de la cadena alimentaria, y endógenos que son sintetizados por la célula; además de los antioxidantes artificiales. Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios.

Antioxidantes exógenos: Como Vitamina E, Vitamina C, Betacaroteno y Flavonoides.

Antioxidantes endógenos: Como Glutación, Coenzima Q, Ácido tiotico.

Antioxidantes artificiales: Comprenden los derivados fenólicos como el butil-hidroxi-anisol (BHA) y el butil-hidroxi-tolueno (BHT), como también los derivados del ácido gálico. **(33, 34)**

Según Hernández, los antioxidantes son sustancias que aisladamente o mezcladas entre sí, son utilizadas en alimentos y bebidas con el objetivo de retardar o evitar las oxidaciones catalíticas; enranciamientos naturales producidos por la acción del aire, luz y trazas metálicas; también utilizados para conservar el alimento retrasando el deterioro, el cual produce decoloración y rancidez, esto debido a la oxidación. **(33)**

Los antioxidantes pueden actuar por medio de diferentes mecanismos:

- Deteniendo la reacción en cadena de oxidación de las grasas.
- Eliminando el oxígeno atrapado o disuelto en el producto
- Eliminando las trazas de ciertos metales, como el cobre y el hierro, que facilitan la oxidación. **(34)**

El valor de la actividad antioxidante se expresa en IC50 que representa la media concentración inhibitoria máxima. Es decir la concentración necesaria del antioxidante que se requiere para inhibir el 50% del radical libre. **(35)**

### **Actividad antioxidante de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales presentan actividad antioxidante probablemente debido a la presencia de compuestos fenólicos como el carvacrol y el timol, esto en plantas aromáticas como *Origanum syriacum* L. y *Origanum vulgare* L. cuya actividad ya fue comprobada **(36, 37)**.

En algunos frutos cítricos, la actividad antioxidante puede atribuirse a la presencia de  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\alpha$ -terpineno y  $\alpha$ -terpinoleno. **(38)**

Las flores de algunas plantas ornamentales procedentes de la tribu Anthemidae (perteneciente a la familia Asteraceae) poseen aceites esenciales con actividad antioxidante como *Dendranthema grandiflora*, *Chrysanthemum morifolium* y *Tanacetum spp*; atribuido a la presencia de sesquiterpenos y monoterpenos, de compuestos como camfor, pinocamfona, tuyona, 1,8-cineol y pulegona. **(39)**

La captación de radicales DPPH y OH por el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume es atribuida a la capacidad de donar Hidrógeno del eugenol (compuesto de naturaleza fenólica), presente en concentraciones significativas; demostrando una mayor actividad el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume que el eugenol, ya que presenta un nivel de IC<sub>50</sub> más bajo que el anterior. **(40)**



## II. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Materiales y Equipos:

#### 2.1.1 *Materiales:*

- Pera de bromo
- Beakers capacidad: 50, 100, 200 mL
- Baguetas de vidrio
- Probeta Florentino
- Frascos Viales
- Frascos pequeños de color ámbar
- Picnómetro
- Placas Petri
- Pipetas (1mL, 2mL, 5 mL, 10mL y 20mL)
- Soporte universal
- Frasco Erlenmeyer
- Tubos de prueba
- Tubos sacabocados
- Asas de Kohle
- Mechero Bunsen
- Pipeta Pasteur
- Frasco para Agar
- Espátula tipo Drigalsky
- Micropipetas (50 $\mu$ L, 200 $\mu$ L y 1000 $\mu$ L)
- Tips de micropipetas
- Tubos de centrifugación graduados

#### 2.1.2 *Equipos:*

- Destilador por arrastre de vapor
- Estufa acoplada a un termómetro digital (Labor Műszeripari Művek (Esztergom), modelo 68-33884.
- Refractómetro Carl Seizz, modelo 74078
- Polarímetro Carl Seizz, modelo 183178
- Cromatógrafo de gases acoplado a Espectrómetro de masas (TRACE MS PLUS TRACE GC)

- Balanza analítica (Denver Instrumental modelo XP-300)
- Autoclave vertical modelo Favill
- Horno esterilizador Fisher Isotemp oven – modelo senior
- Equipo de Baño de agua (Labor Műszeripari Művek (Esztergom), modelo 86-42365.
- Horno Microondas Miray capacidad 10 litros
- Agitador Fisher - Minishaker
- Espectrofotómetro Labomed Inc., UV-VIS Double Beam PC and scanning autocell.
- Refrigeradora Coldex

### **2.1.3 Reactivos:**

Los reactivos utilizados más importantes:

- 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) Sigma
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico 97%) Aldrich,
- Ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Chemical Co., Gillingham, Dorset, UK)
- Tween 20 Merck – Schuc – Chardt
- Alcohol etílico absoluto grado A.C.S. Quimex

### **2.1.4 Medios de Cultivo:**

- Agar Trypticase Soya (Merck)
- Agar Mueller - Hinton (Merck)
- Agar Dextrosa Sabouraud (Merck)

## **2.2 Material Biológico**

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25933
- *Staphylococcus epidermidis* (cepa clínica)
- *Bacillus subtilis* (cepa ambiental)
- *Escherichia coli* (cepa clínica)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Candida albicans* (levadura) ATCC 10231
- *Klebsiella spp* (cepa clínica)

### **2.3 Entidades donde se desarrolló la investigación:**

La destilación por arrastre con vapor de agua del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*, se desarrolló en el laboratorio de Química Orgánica, del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. El estudio de la determinación antibacteriana y antifúngica se realizó en el Instituto de Microbiología y Parasitología “Simón Pérez Alva” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. El análisis de la actividad antioxidante se efectuó en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición “Alberto Guzmán Barrón”, de la Facultad de Medicina Humana de la UNMSM. La elucidación de los componentes químicos del aceite esencial, de *Tagetes elliptica Smith* (chincho) se llevó a cabo en el Departamento de Análisis Toxicológico de la Morgue Central de Lima.

### **2.4 Preparación de la muestra.**

#### **2.4.1 Recolección de la Muestra:**

La planta en estudio, *Tagetes elliptica smith*, fue recolectada en el poblado Monterrey a orillas del río Santa, en la provincia de Huaraz, Región Ancash a 2700 m.s.n.m. Posteriormente las hojas fueron separadas del tallo y de las inflorescencias, luego fueron pesadas en una balanza común para luego continuar con la extracción del aceite esencial. Paralelamente, una muestra de la planta fue llevada al Museo de Historial Natural para su identificación taxonómica (ver Anexo).

#### **2.4.2 Extracción del aceite esencial:**

Para la extracción del aceite esencial se aplicó el método por arrastre con vapor de agua. Se utilizó 5.750 kg de *Tagetes elliptica Smith*, colocándose aproximadamente 1.5 kg de hojas de *Tagetes elliptica Smith* en la tolva del destilador, se procedió a llenar con agua el balón destilador; previa instalación del conducto refrigerante, haciendo circular el agua a través del mismo. Luego se llevó a calentamiento hasta desprendimiento de un líquido inmiscible conteniendo vapor de agua condensada y el aceite esencial, siendo recolectados en un embudo, para posteriormente decantar el aceite esencial.

Luego se procedió a eliminar todo rastro de agua con sulfato de sodio anhidro, guardándose en un frasco de vidrio color ámbar bajo refrigeración a una temperatura de 4°C. **(41)**

## **2.5 Análisis Fisicoquímico del Aceite Esencial**

Se determinó las principales constantes físicas del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*, por métodos instrumentales que a continuación se detallan:

### **2.5.1 Densidad Relativa:**

*Procedimiento:* En un picnómetro, aforado a un volumen fijo, se llena de agua, se cierra el envase para posteriormente pesarlo en una balanza analítica; luego de vaciar el agua, se llena el picnómetro con el Aceite esencial de “chincho”, y se lleva a pesarlo a la balanza analítica. La densidad se obtiene dividiendo la masa del líquido por el aforo del frasco. **(21)**

### **2.5.2 Índice de Refracción:**

*Procedimiento:* Previamente se calibró el refractómetro con agua bidestilada; luego se tomó aproximadamente 0.5 mL del aceite esencial y se colocó encima de la lámina del refractómetro para efectuar la lectura del valor de refracción que expresa el prisma, esto por medio del campo de imagen. **(22, 23, 24)**

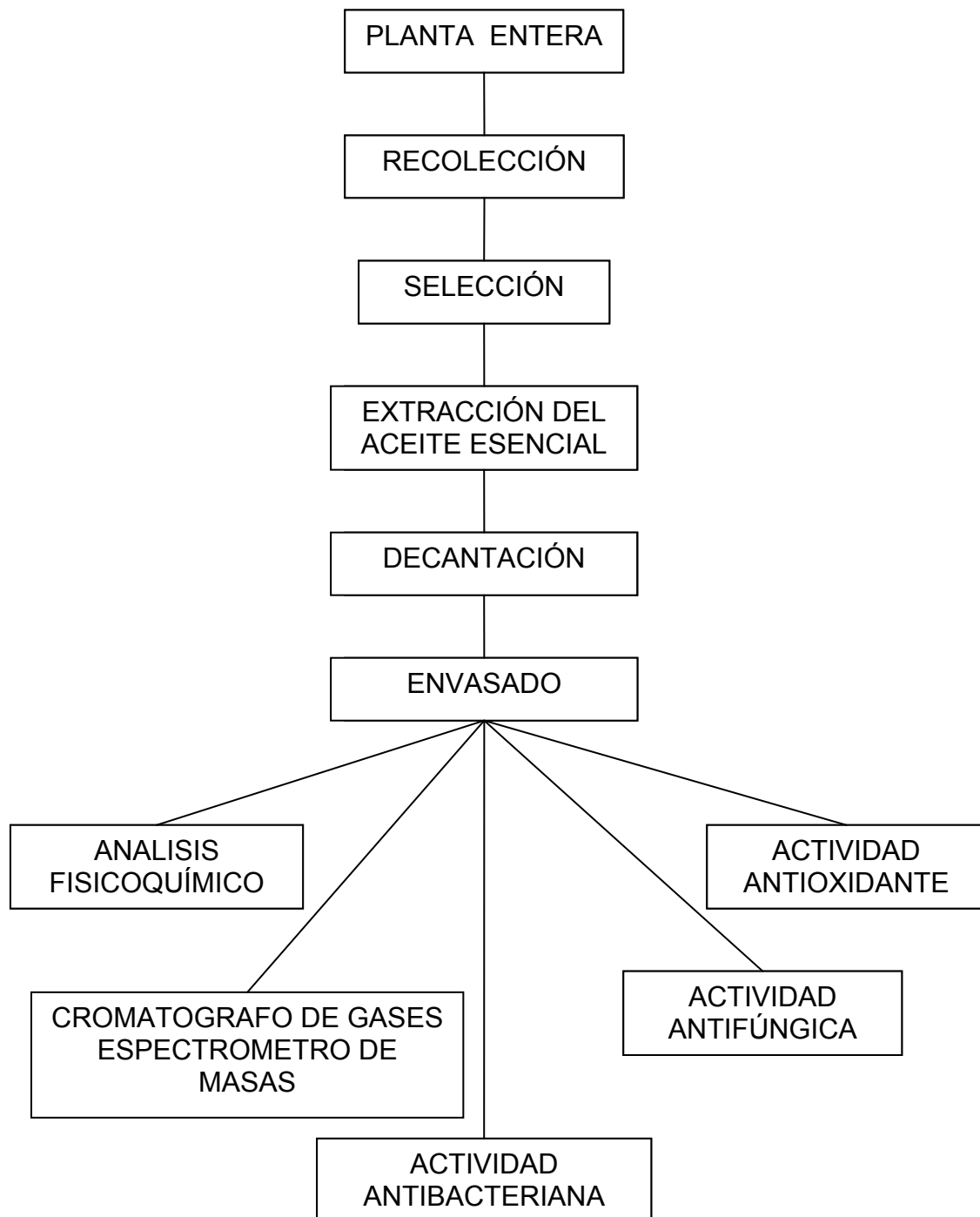
### **2.5.3 Rotación Óptica:**

*Procedimiento:* Se colocó la muestra de aceite esencial en el tubo de contención, llenándolo por completo, luego de cerrarlo herméticamente, se llevo al polarímetro para efectuar la lectura correspondiente. **(22, 25)**

### **2.5.4 Índice de Acidez:**

*Procedimiento:* En un frasco Erlenmeyer se colocó 1 mL de muestra a 20 mL de una solución 1:1 de alcohol etílico de 96° y éter; luego en una bureta se llenó con Hidróxido de Potasio 0.025 N para llevar a titulación de la muestra de aceite esencial. Se obtuvo de gasto 1.4 mL de Hidróxido de potasio, y con dicho dato se procedió a calcular el Índice de Acidez. **(26)**

## DIAGRAMA DE FLUJO DE PREPARACION DE LA MUESTRA



## **2.6 Análisis por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas:**

### **2.6.1 Definición:**

**2.6.1.1 Cromatografía de Gases:** Es una técnica de análisis instrumental aplicada al estudio de muestras volátiles, mezclas complejas de hidrocarburos, productos vegetales, sustancias ecotóxicas volátiles, aromas en la industria alimentaria, fragancias en la industria cosmética. Es una técnica de reparto líquido – gas que se realiza en una columna rellena de un sólido, que actúa como soporte; la fase estacionaria esta formada por un líquido no volátil que impregna el soporte; y la fase móvil es un gas inerte (Nitrógeno, Helio, Argón e Hidrógeno) que fluye por la columna a velocidad constante. **(42, 43)**

**2.6.1.2 Espectrometría de Masas:** Es una herramienta de análisis instrumental utilizado para identificar los elementos presentes en muestras de materias, y determinar sus concentraciones. Consta de las siguientes etapas: Atomización, Conversión de los átomos en un flujo de iones (de una sola carga), Separación de los iones formados en relación masa/carga, y Conteo del número de iones de cada tipo. **(44)**

**2.6.1.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas:** La combinación de cromatografía de gases con espectrometría de masas (CG-EM), se denomina de método acoplado, donde el espectrómetro de masas es un ente detector. Con la espectrometría de masas no solo es factible determinar los picos de una especie, sino también identificar los diversos componentes sin resolver. En la combinación cromatógrafo de gases - espectrómetro de masas, el efluente de la columna se introduce directamente en la cámara de ionización de dicho espectrofotómetro de forma que se elimina la mayor parte del gas portador. En la cámara de ionización, se ionizan todas las moléculas y los iones se separan de acuerdo con su cociente masa/carga, que sirve para identificar el compuesto. **(43, 44)**

### **2.6.2 Procedimiento:**

El aceite esencial de Tagetes elliptica Smith fue analizado por cromatografía de gases – espectrometría de masas; para luego comparar los picos y

espectros con estándares almacenados en “librerías virtuales”; y así determinar la composición cualitativa del aceite esencial.

## **2.7 Determinación de la actividad Antibacteriana y Antifúngica por el método de difusión en agar y dilución en agar para el CMI:**

Se realizaron pruebas de actividad antibacteriana y antifúngica, y de concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*. A continuación se detallan los métodos utilizados:

### **2.7.1 Método de Difusión en Agar (Actividad Antibacteriana y Antifúngica):**

**2.7.1.1 Fundamento:** En esta prueba se enfrenta la bacteria o la levadura integrada previamente en el medio de crecimiento sólido Agar Mueller Hinton o Agar Dextrosa Sabouraud respectivamente versus una muestra de aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*, la cual se expresa en la presencia de un halo de inhibición producto de la difusión del antibiótico en el medio sólido; halo que corresponde a la cantidad o concentración del antibiótico. **(4,45)**

#### **2.7.1.2 Procedimiento:**

Preparación del inóculo: Se trabajó con los siguientes microorganismos:

Bacterias

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25933
- *Staphylococcus epidermidis* (cepa clínica)
- *Bacillus subtilis* (cepa ambiental)
- *Escherichia coli* (cepa clínica)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Levadura

- *Candida albicans* ATCC 10231

Los cultivos bacterianos y la levadura fueron reactivados por medio del Agar Tripticasa Soya y Agar Dextrosa Sabouraud respectivamente. Se prepararon los respectivos inóculos primero tomando con un asa de Kohle, y en condiciones asépticas, una “asada” de las colonias de los microorganismos reactivados para suspensión con 5 mL de Solución Salina estéril al 0.9%,

ajustándose la turbidez al tubo 0.5 de la escala de McFarland ( $1 - 1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

Preparación de las muestras: Se prepararon las muestras en concentraciones de 100%, 50% y 10% con el aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*, más el alcohol etílico absoluto como solvente, tal como se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 3. Preparación de muestras para la determinación de la actividad antibacteriana**

	Muestras		
	100%	50%	10%
<b>Aceite esencial</b>	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L	10 $\mu$ L
<b>Etanol absoluto</b>	-	50 $\mu$ L	90 $\mu$ L
<b>Total</b>	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L

Preparación de las placas: Para ello se reconstituyó el Agar Mueller Hinton y el Agar Dextrosa Sabouraud con agua destilada, luego se llevó a autoclavado, se enfrió entre 45° - 50°C; y se procedió a incorporar 0.2 mL del inóculo de bacteria o levadura por cada 20 mL de Agar Mueller Hinton o Agar Dextrosa Sabouraud, se agitó para homogenizar y posteriormente se procedió a repartir en cada placa Petri 20 mL de Agar Mueller Hinton conteniendo un tipo de cepa bacteriana, o levadura, para 5 placas bajo la siguiente distribución:

**Tabla 4. Distribución de placas Petri para la determinación de la actividad antibacteriana**

<b>Muestra</b>			<b>Control negativo</b>	<b>Control Positivo</b>
<b>Placa 1</b>	<b>Placa 2</b>	<b>Placa 3</b>	<b>Placa 4</b>	<b>Placa 5</b>
100%	50%	10%	Etanol	Antibióticos

Luego se dejó enfriar las placas para proceder a rotularlas para su posterior evaluación; y con ayuda de un sacabocado estéril de 10 mm se hizo los pozos en el centro de la placa, los sobrantes se retiraron con el asa de Kohle.



Incorporación de la muestra e Incubación del Inóculo (cuadro referencial ilustrativo): Se colocó 0.1 mL de muestra de concentraciones de 100%, 50% y 10% en tres placas respectivamente, luego en el control negativo se colocó 0.1 mL de alcohol absoluto; y en el de control positivo, para las bacterias se utilizaron discos de Oxacilina (1 µg/disco), Cloranfenicol (30 µg/mL), Ciprofloxacino (5 µg/disco), y para la levadura se utilizaron Nistatina (0.2 mg/mL) y Ketoconazol (0.2 mg/mL), diluidas en Dimetilsulfóxido (DMSO). Luego se dejó en reposo por una hora, esto con la intención de permitir una mejor difusión de la muestra en el agar; después se llevó a incubación por 24 horas a 35°C para las bacterias y a 48 horas a 29°C para *Cándida albicans*. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Lectura de los resultados: Luego de la incubación, se observó la presencia de halos de inhibición de crecimiento, y se procedió a tomar la medida del diámetro de estos en milímetros. Las placas que presentaron actividad antibiótica y antifúngica significativa (definida como una zona clara perfecta con un diámetro mayor a 18 mm) posteriormente se sometieron a una nueva evaluación para determinar su Concentración Mínima Inhibitoria. (46)

### **2.7.2 Método de Dilución en Agar (Concentración Mínima Inhibitoria):**

**2.7.2.1 Fundamento:** Utilizado para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria, esta prueba se basa en la ausencia de crecimiento bacteriano o fúngico a una determinada concentración de aceite esencial; para ello se enfrenta diluciones dobles seriadas del antibiótico preparados en el medio de cultivo versus inóculos bacterianos y fúngicos. La menor concentración de la muestra (aceite esencial) que inhibe el crecimiento de la bacteria o levadura se conoce como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). (45)

#### **2.7.2.2 Procedimiento:**

Preparación del Inóculo: Se trabajaron con todos los microorganismos mencionados en la anterior prueba ya que dieron positivo a la prueba de actividad antibacteriana. Para esta prueba, las bacterias y la levadura fueron reactivadas en el Agar Tripticasa Soya y el Agar Dextrosa Sabouraud

respectivamente. Se tomó una alícuota de cada cepa con ayuda de la asa de Kohle y se suspendió en un tubo que contenía 5 mL de Solución Salina estéril al 0.9% a turbidez 0.5 de la escala de McFarland ( $1 - 1.5 \times 10^8$  UFC/mL); de dicha suspensión se tomó 0.1 mL y se llevó a un segundo tubo de ensayo hasta completar 10 mL, conteniendo  $10^6$  UFC/mL; de esta última suspensión se tomó 0.1 mL y se llevó a un tercer tubo de ensayo hasta completar 10 mL, conteniendo  $10^4$  UFC/mL. **(47,48)**

*Preparación de las Muestras:* Se prepararon diluciones dobles seriadas en 14 viales de 0.0195 µL/mL - 160 µL/mL tomando como solvente el alcohol absoluto, primero preparándose una dilución stock de 160 µL/mL de la cual se derivó las diluciones siguientes, de acuerdo al esquema de dilución de la tabla 5; y para la dilución final 1:20 en la placa petri de 0.000977 µL/mL – 8 µL/mL se tomó como diluyente final el Agar Mueller Hinton y el Agar Dextrosa Sabouraud para las bacterias y levadura respectivamente.

*Preparación de las Placas e Incorporación de la muestra:* Se utilizó el agar Mueller Hinton y el agar Dextrosa Sabouraud; los cuales fueron previamente reconstituidos con agua destilada, luego autoclavado y enfriada a temperatura de 40° C. En tubos de ensayo con tapa rosca se vertió 19 mL de agar Mueller Hinton o de agar Dextrosa Sabouraud, y se agregó 0.1 mL de Tween 20, se agitó suavemente evitando la formación de espuma, e inmediatamente se agregó 1 mL de la muestra del vial de la dilución doble, se agitó suavemente hasta miscibilidad total, y se vertió en la placa petri que fue previamente rotulada con la dilución y el microorganismo ensayado; de la misma manera se trabajó con las restantes placas.

Adicionalmente, para las bacterias se trabajó con 2 placas conteniendo la primera Agar Mueller Hinton más Tween 20, y la segunda Agar Mueller Hinton más Tween 20 y la cepa bacteriana, las cuales se tomaron como blanco y control negativo. Del mismo modo para la levadura se trabajó con el Agar Dextrosa Sabouraud.

Incorporación e Incubación del inóculo: Del tubo que contiene la suspensión bacteriana ( $10^4$  UFC/mL) se tomó 0.1 mL con la micropipeta y se colocó en la superficie del agar, y se esparció con ayuda de la espátula de Drigalsky; se dejó en reposo por 1 hora para luego llevar a incubación a 35°C por 24 horas para las bacterias y por 48 horas para *Cándida albicans*. Las pruebas se hicieron por triplicado.

**Tabla 5. Dilución seriada doble del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith**

<b>Alícuota</b>	1 mL
<b>Proporción en la placa</b>	1 en 20

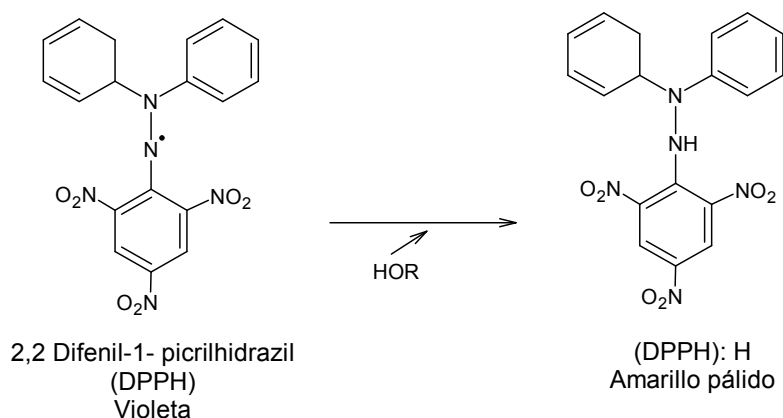
Nº dilución	Muestra (μL/mL)	Vol. Muestra ( mL)	Vol. (mL) Solvente	[ ] Intermedia (μL/mL)	[ ] Final (mL/mL)	Dilución
1	160	-	-	160	$8 \times 10^{-3}$	D1
2	160	0.5	0.5	80	$4 \times 10^{-3}$	D2
3	160	0.5	1.5	40	$2 \times 10^{-3}$	D3
4	160	0.5	3.5	20	$1 \times 10^{-3}$	D4
5	20	0.5	0.5	10	$0.5 \times 10^{-3}$	D5
6	20	0.5	1.5	5	$0.25 \times 10^{-3}$	D6
7	20	0.5	3.5	2.5	$1.25 \times 10^{-4}$	D7
8	2.5	0.5	0.5	1.25	$6.25 \times 10^{-4}$	D8
9	2.5	0.5	1.5	$6.25 \times 10^{-1}$	$3.13 \times 10^{-5}$	D9
10	2.5	0.5	3.5	$3.13 \times 10^{-1}$	$1.56 \times 10^{-5}$	D10
11	0.3125	0.5	0.5	$1.56 \times 10^{-1}$	$7.81 \times 10^{-6}$	D11
12	0.3125	0.5	1.5	$7.81 \times 10^{-2}$	$3.91 \times 10^{-6}$	D12
13	0.3125	0.5	3.5	$3.91 \times 10^{-2}$	$1.95 \times 10^{-6}$	D13
14	0.0390625	0.5	0.5	$1.95 \times 10^{-2}$	$9.77 \times 10^{-7}$	D14

Lectura de los resultados: Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria, se toma en cuenta la placa donde no se aprecia crecimiento bacteriano ya que a una concentración determinada inhibe el crecimiento bacteriano y fúngico.

## 2.8 Determinación de la actividad Antioxidante:

### 2.8.1 Captación del radical libre difenil picril hidrazilo (DPPH):

**2.8.1.1 Fundamento:** Se basa en la reducción del radical libre estable 2,2 – difenil picril hidrazilo, mediante la captación de un átomo de Hidrógeno que dona el antioxidante (sustancia atrapadora de radicales libres). Se cuantifica midiendo la reducción de la medida de la absorbancia a 517 nm. **(49, 50)**



Ref. Marklund S. and Marklund G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase.

**Figura 4. Reducción del radical libre 2,2 – difenil – 1 – picril hidrazilo**

#### **2.8.1.2 Procedimiento:**

Preparación de muestras: Se preparó una solución etanólica de aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith* concentración de 8 $\mu$ L/mL (6.24 mg/mL) en un tubo de ensayo, y en una batería de 4 tubos se procedió a preparar lo siguiente (ver Tabla 6):

**Tabla 6. Preparación de las muestras para la prueba de Captación del radical libre difenil picril hidrazilo (DPPH)**

Tubos	I	II	III	DPPH
<b>Muestra Problema</b>	0.2 mL	0.1 mL	0.05 mL	-
<b>Etanol</b>	-	0.1 mL	0.15 mL	0.2 mL
<b>DPPH 20mg/mL</b>	0.8 mL	0.8 mL	0.8 mL	0.8 mL
<b>Total</b>	1mL	1mL	1mL	1mL
<b>Concentración Final</b>	1.6 $\mu$ L/mL	0.8 $\mu$ L/mL	0.4 $\mu$ L/mL	-

La solución de DPPH (2,2 –difenil picril hidrazilo) se preparó en metanol. Se usó como estándar antioxidante una solución de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8 –tetra metil croman-2-carboxílico), sustancia sintética derivada de la vitamina E. Se preparó una batería de tres tubos como se muestra a continuación (ver Tabla 7):

**Tabla 7. Preparación de tubos para su lectura en el espectrofotómetro**

<b>Tubos</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>DPPH</b>
<b><i>Trolox 0.018mg/mL</i></b>	1 mL	0.67 mL	0.3 mL	-
<b><i>Diluyente</i></b>	-	0.33 mL	0.7 ml	-
<b><i>Alícuota</i></b>	0.2 mL	0.2 mL	0.2 mL	-
<b><i>Etanol</i></b>	-	-	-	0.2 mL
<b><i>DPPH</i></b>	0.8 mL	0.8 mL	0.8 mL	0.8 mL
<b><i>Volumen final</i></b>	2 mL	2 mL	2mL	1 mL
<b><i>Concentración Final</i></b>	1.2 µg/mL	2.41 µg/mL	3.6 µg/mL	-

### **Lectura de Resultados**

Las muestras se leyeron a longitud de onda de 517 nm en un espectrofotómetro: espectro UV.VIS Double Beam PC.

### **2.8.2 Captación del radical superóxido producido por pirogalol:**

**2.8.2.1 Fundamento:** Se basa en la autooxidación espontánea del pirogalol en medio básico. Al generarse el radical  $O_2^{\cdot -}$  en el medio de reacción, se acelerará la autooxidación del pirogalol. La presencia de un secuestrador del radical anión superóxido  $O_2^{\cdot -}$  inhibirá la reacción de autooxidación del pirogalol. **(51, 52)**

### **2.8.2.2 Procedimiento:**

Preparación de muestras: Con el aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*, se preparó una solución etanólica de concentración de 4 µL/mL y se trabajó una batería de tres tubos (ver tabla 8):

**Tabla 8. Preparación de las muestras para la prueba de Captación del radical superóxido producido por pirogalol**

<b>Tubos</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
<b><i>Muestra Problema</i></b>	40 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
<b><i>Buffer Tris - HCl</i></b>	910 $\mu\text{L}$	930 $\mu\text{L}$	940 $\mu\text{L}$
<b><i>Pirogalol</i></b>	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
<b><i>Concentración Total</i></b>	80 $\eta\text{L/mL}$	40 $\eta\text{L/mL}$	20 $\eta\text{L/mL}$

Además se preparó una solución de ácido ascórbico a 100 $\mu\text{g/mL}$  como antioxidante estándar, y en una batería de tres tubos se procedió a preparar las siguientes concentraciones (ver Tabla 9):

**Tabla 9. Preparación de tubos para su lectura en el espectrofotómetro**

<b>Tubos</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
Ácido ascórbico 100 $\mu\text{g/mL}$	0.015 mL	0.02 mL	0.03 mL
Buffer Tris – HCl	0.935 mL	0.93 mL	0.92 mL
Pirogalol	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL
Concentración Total	1.5 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$

**Lecturas de Resultados:** Las muestras se leyeron a longitud de onda de 325 nm en un espectrofotómetro UV- Visible.

### III. RESULTADOS

#### 3.1 Análisis Fisicoquímico del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith:

##### 3.1.1 Rendimiento:

El rendimiento, posterior a la extracción del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith, que resultó por el método por arrastre con vapor de agua fue de 0.49% (P/P).

##### 3.1.2 Características Organolépticas del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith: (ver Tabla 10)

Tabla 10.

<b>Características organolépticas</b>	<b>Para el aceite esencial de <i>Tagetes elliptica</i> Smith</b>
Olor	Sui generis
Color	Amarillo
Sabor	Picante-astringente
Aspecto general	Líquido transparente y fluido

##### 3.1.3 Propiedades Fisicoquímicas del Aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith: (ver Tabla 11)

Tabla 11.

<b>Propiedades Fisicoquímicas</b>	<b>Valores</b>
Densidad Relativa	0.78 g/mL
Índice de Refracción	1.448
Rotación Específica	(-) 3° 25
Índice de Acidez	1.8424 mg/mL

##### **Solubilidad frente a solventes orgánicos:** (Ver Tabla 12)

Tabla 12.

<b>Solvente</b>	<b>Solubilidad del aceite esencial</b>
<b>Alcohol etílico Absoluto</b>	(+)
<b>Alcohol al 80%</b>	(+)
<b>Alcohol al 50%</b>	(-)
<b>n – Hexano</b>	(+)
<b>Diclorometano</b>	(+)
<b>Cloroformo</b>	(+)
<b>Éter etílico</b>	(+)

### 3.2 Análisis por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas

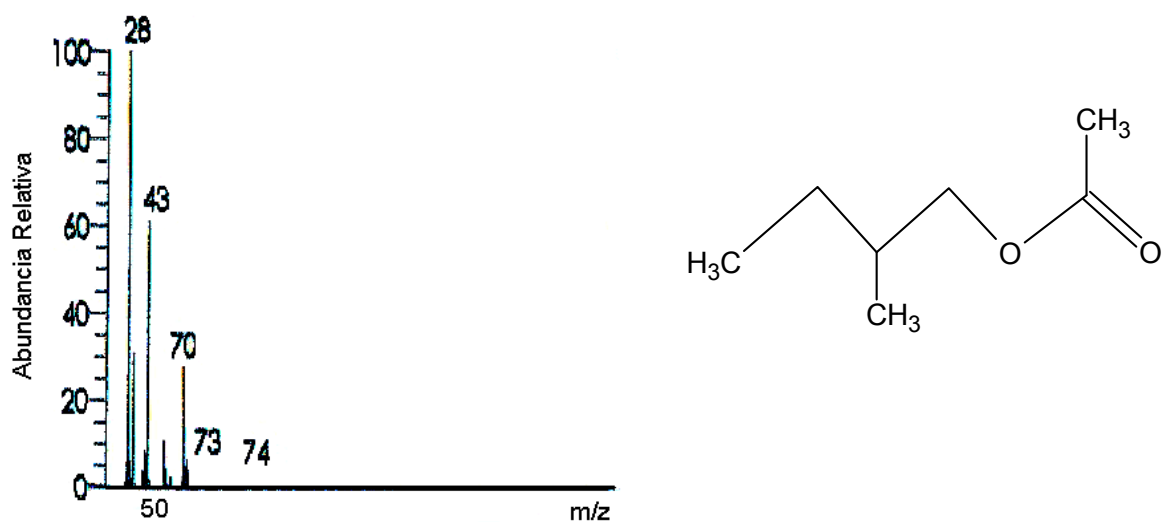
#### 3.2.1 Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith determinado por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM): (ver Tabla 13)

Tabla 13.

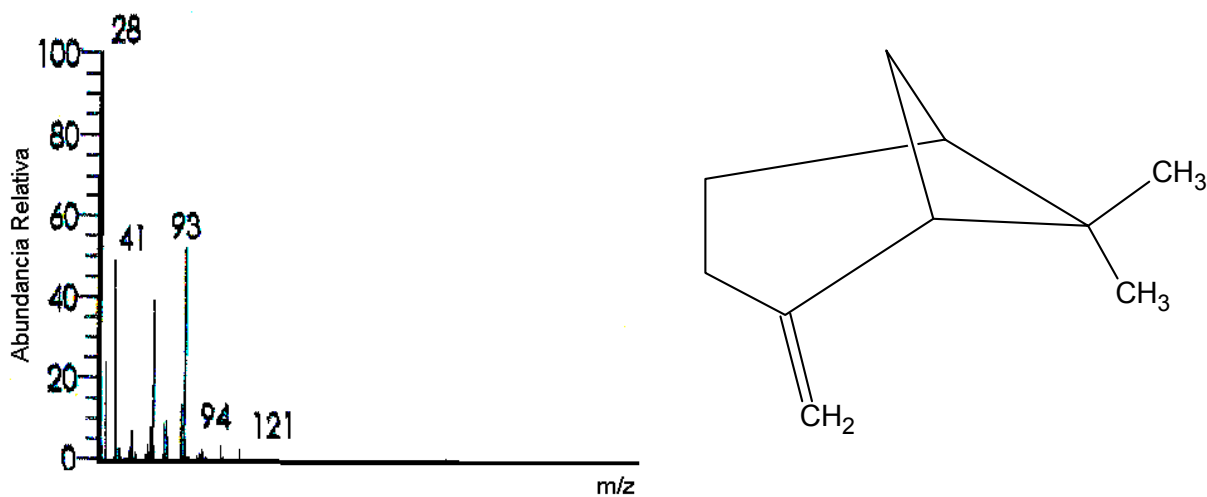
COMPONENTES QUÍMICOS	TIEMPO DE RETENCION (minutos)
2-Metil - 1 - butil acetato	2.51
2(10) - Pineno, (1S, 5S)-(-)-	4.37
1R - $\alpha$ - Pineno	5.47
4 - Etil - 4 metil - 1 - hexeno	6.41
1 - Pentanol, 5 - (ciclopropil metileno) -	7.13
3 - t - Butil - 6 - metil - 2H - pirano	8.8
l - Verbenona	11.05
Metoxicitronelal	12.6
Isocariofileno	15.4
$\tau$ - Cadineno	16.97
Cadina - 3,9 - dieno	17.9
$\alpha$ - Cadinol	21.23
Ácido ciclopropanocarboxílico, 2-metil- , 2,6 -di-t-butil -4 - metilfenil éster	32.41
Forbol	34.15
Ambrosin	38.72
Butanimida	49.41



**3.2.2 Estructura química de los componentes del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith determinado por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM)**



**Figura 5. Elucidación de 2 – Metil – 1 – butil acetato del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith**



**Figura 6. Elucidación de 2(10) – pineno, (1S, 5S) – ( - ) del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith**

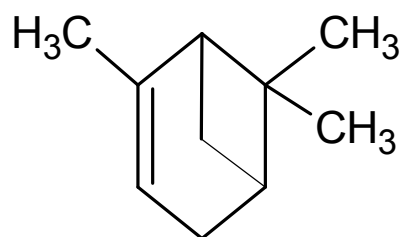
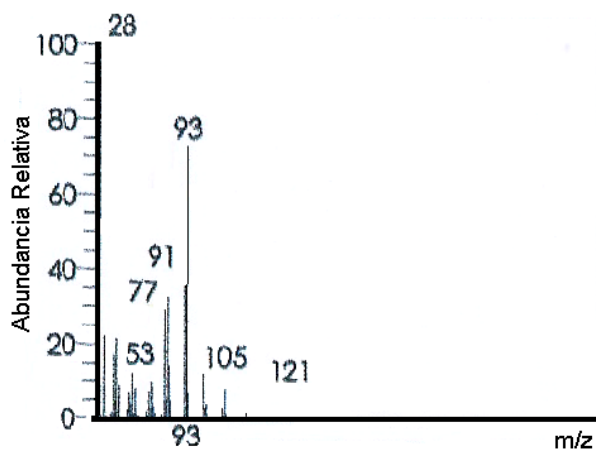


Figura 7. Elucidación de 1R- α –Pineno del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*

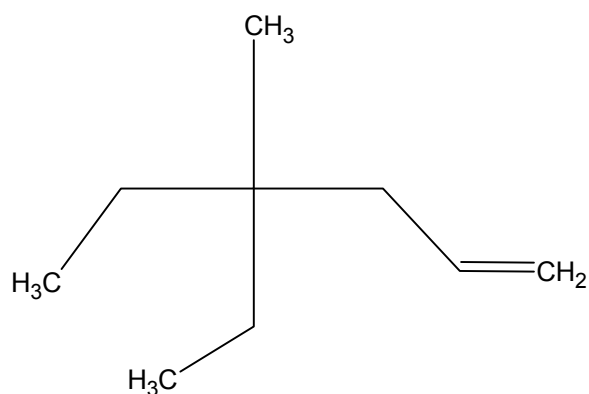
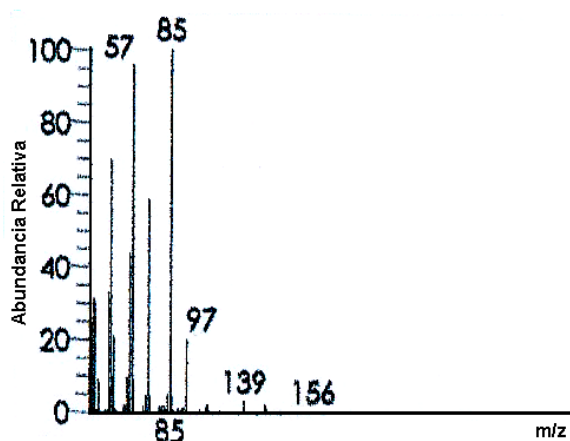


Figura 8. Elucidación de 4 – Etil – 4 – metil – 1 – hexeno del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*

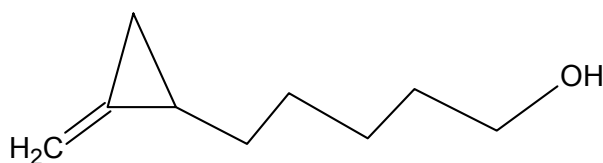
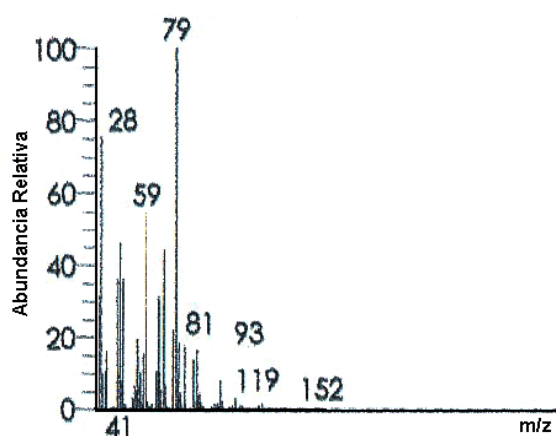


Figura 9. Elucidación de 1 – pentanol, 5 – (ciclopropilmetileno) del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*

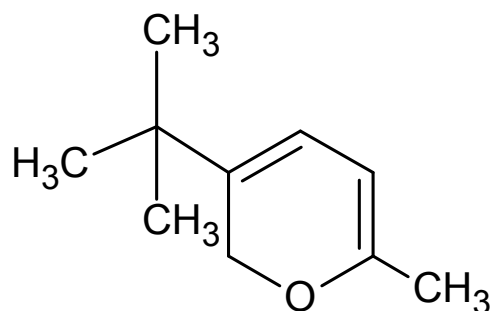
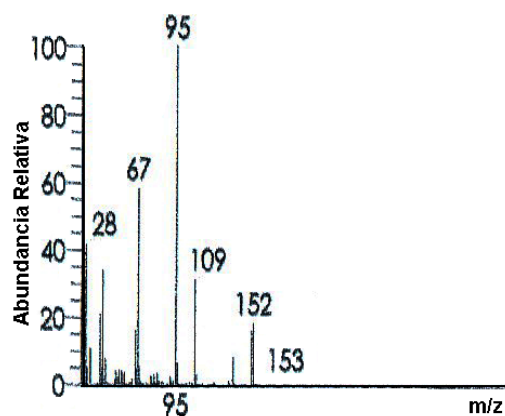


Figura 10. Elucidación de 3 – t – butil – 6 – metil – 2H – pirano del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith

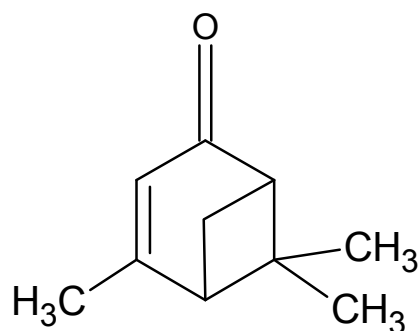
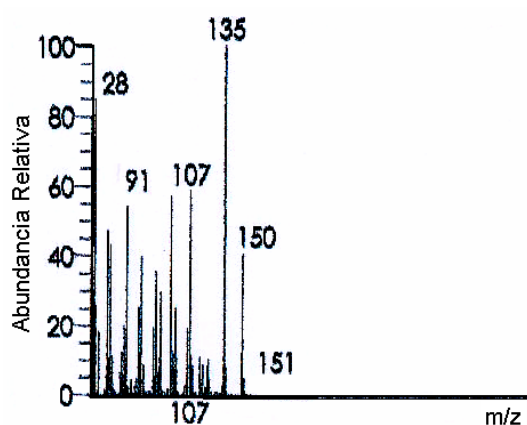


Figura 11. Elucidación de 1 – Verbenona del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith

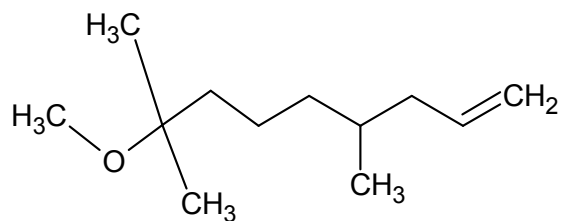
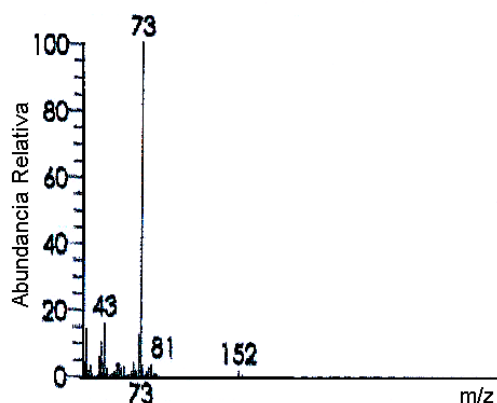


Figura 12. Elucidación de Metoxicitronelal del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith

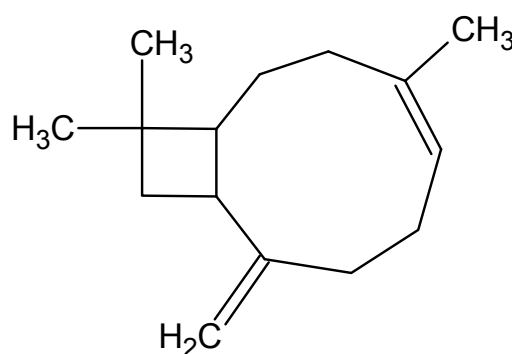
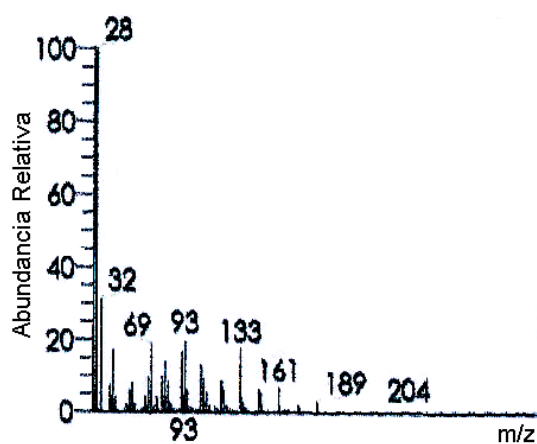


Figura 13. Elucidación de Isocariofileno del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith

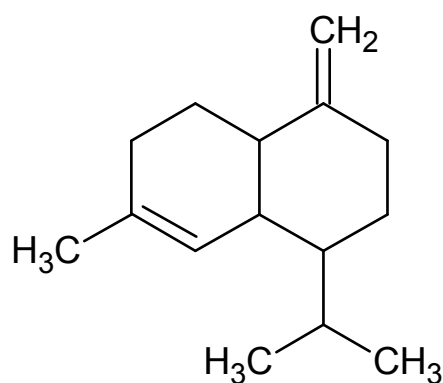
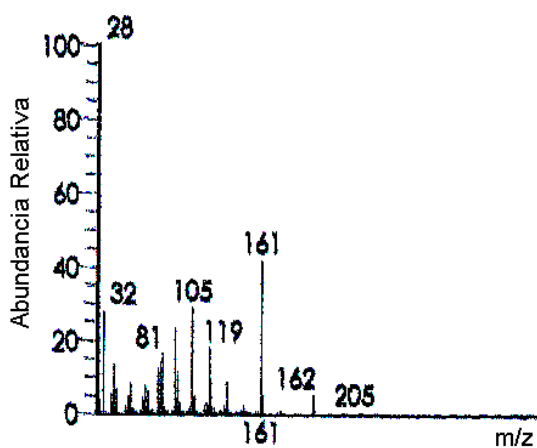


Figura 14. Elucidación de τ - Cadineno del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith

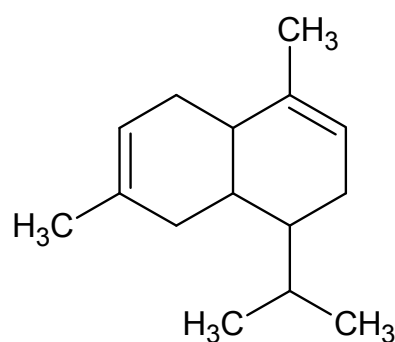
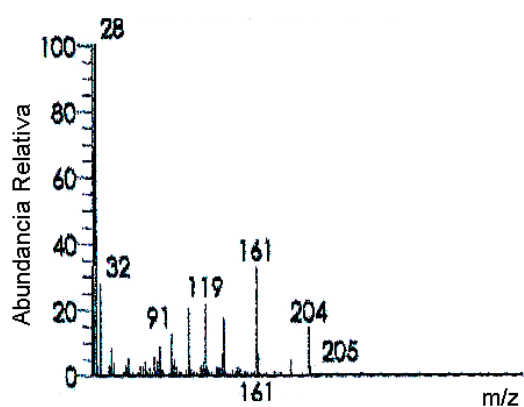


Figura 15. Elucidación de Cadina – 3, 9 dieno del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith

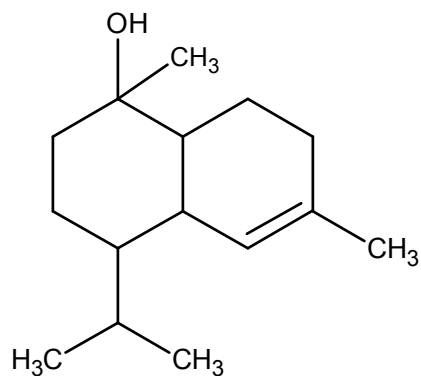
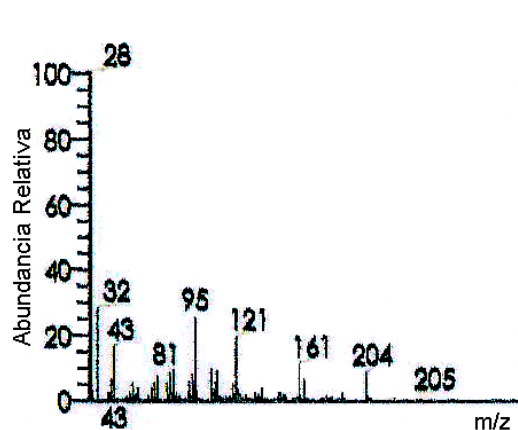


Figura 16. Elucidación de  $\alpha$  - Cadinol del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith

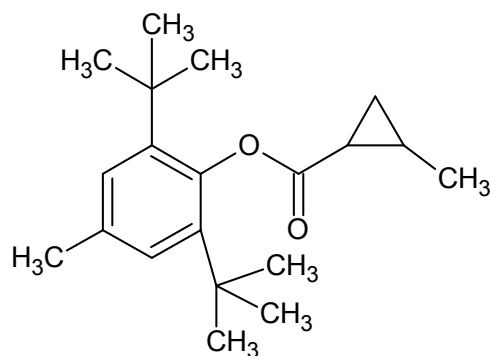
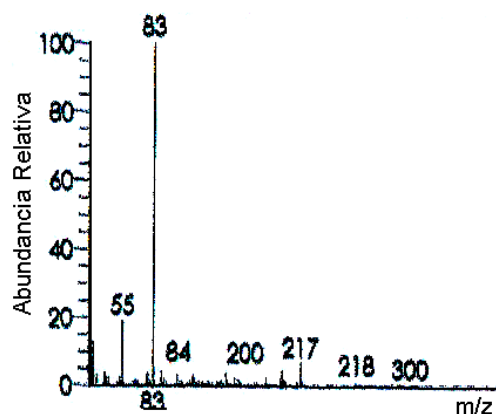


Figura 17. Elucidación del Ácido ciclopropanocarboxílico, 2-metil-, 2,6 -di-t-butil - 4 - metilfenil éster del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith

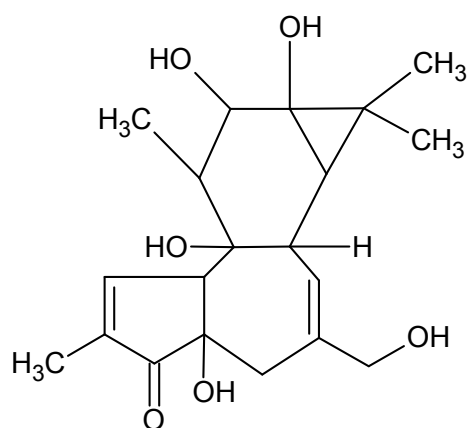
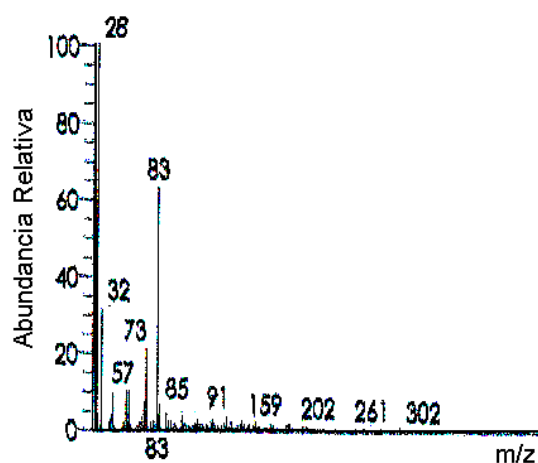
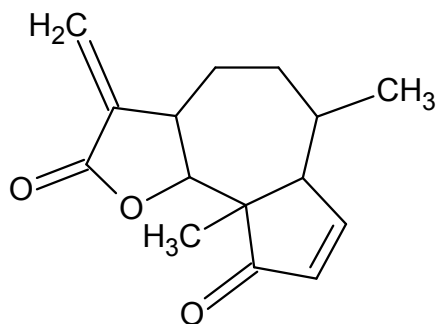
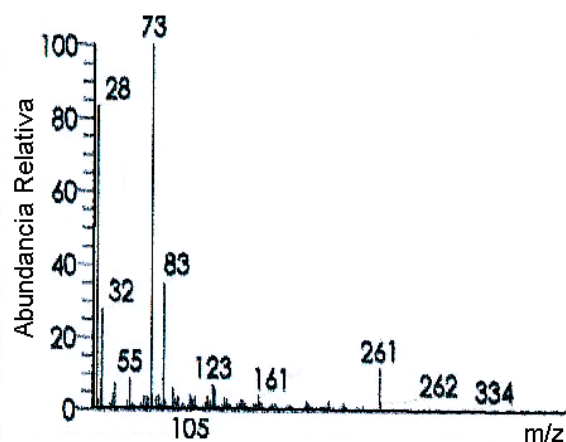
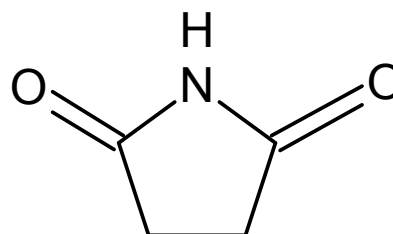
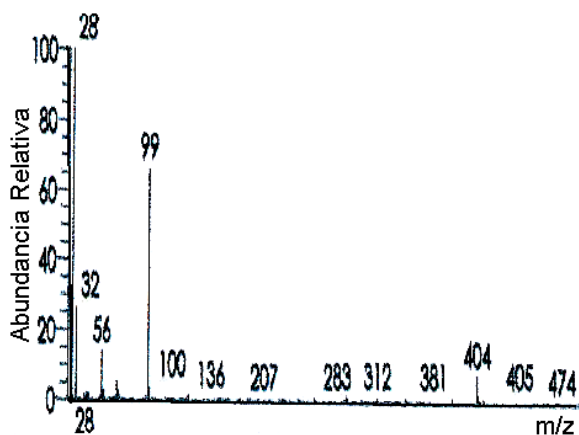


Figura 18. Elucidación de Forbol del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith



**Figura 19. Elucidación de Ambrosin del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith**



**Figura 20. Elucidación de Butanimida del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith**

### 3.3 Determinación de la actividad Antibacteriana y Antifúngica:

#### 3.3.1 Actividad Antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith:

De las placas ensayadas en la parte experimental se muestran los siguientes resultados (ver Tabla 11).

#### 3.3.2 Actividad Antifúngica del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith:

De las placas ensayadas se muestran los siguientes resultados. (ver Tabla 11)

**Tabla 11. Actividad Antibacteriana y Antifúngica del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith**

Microorganismo	Halo de Inhibición ( <i>Tagetes elliptica</i> Smith) en mm			Fármacos Antibióticos en mm			Fármacos Antifúngicos en mm	
	100%	50%	10%	Oxa	Clor	Cipr	Nist	Keto
<i>S. aureus</i> (ATCC25933)	65± 5.56	46±2.82	25±3	25	20	NSP	-	-
<i>S. epidermidis</i> (cepa clínica)	56	42.67±7.37	19.33±2.52	14	R	NSP	-	-
<i>B. subtilis</i> (cepa ambiental)	33.67±0.58	27.2±3.83	17±1.41	23	18	NSP	-	-
<i>E. coli</i> (cepa clínica)	25 ±1.41	21±1.41	14.5±0.71	NSP	19	R	-	-
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	32±6.93	27±4.58	20.25±5.56	NSP	R	30	-	-
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	47.5±0.71	44±2.83	28±2.83	-	-	-	38	25

NSP: No se probó; R: Resistente; Oxa: Oxacilina; Clor: Cloranfenicol; Cipr: Ciprofloxacino; Nist: Nistatina; Keto: Ketoconazol

### 3.3.3 Concentración Mínima Inhibitoria:

Las 14 diluciones de las muestras analizadas presentan los siguientes resultados (ver Tabla 12)

**Tabla 12. Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith (chincho)**

Microorganismos	Concentración mínima inhibitoria (CMI)		
	V/V (μL/mL)	P/V(μg/mL)	%(V/V)
<i>S. aureus</i> (ATCC 25933)	<9.76X10 <sup>-4</sup>	<7.62X10 <sup>-1</sup>	<9.76X10 <sup>-5</sup>
<i>S. epidermidis</i> (cepa clínica)	0.125	97.5	0.0125
<i>B. subtilis</i> (cepa ambiental)	0.5	390	0.05
<i>E. coli</i> (cepa clínica)	<9.76X10 <sup>-4</sup>	<7.62X10 <sup>-1</sup>	<9.76X10 <sup>-5</sup>
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<9.76X10 <sup>-4</sup>	<7.62X10 <sup>-1</sup>	<9.76X10 <sup>-5</sup>
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	1	780	0.1

### 3.4 Determinación de la actividad Antioxidante:

#### 3.4.1 Captación del radical difenilpicrilhidrazilo (DPPH):

Los resultados obtenidos de la capacidad de captación del radical DPPH del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith comparado con el Trolox se presentan en la Figura 21 y 22.

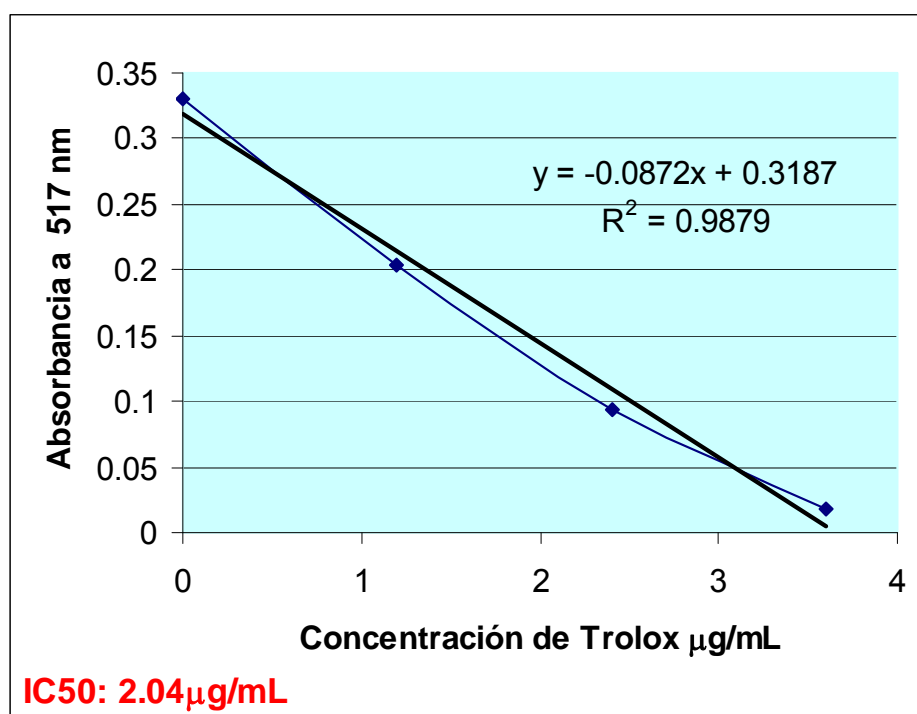


Figura 21. Curva de captación de DPPH del Trolox

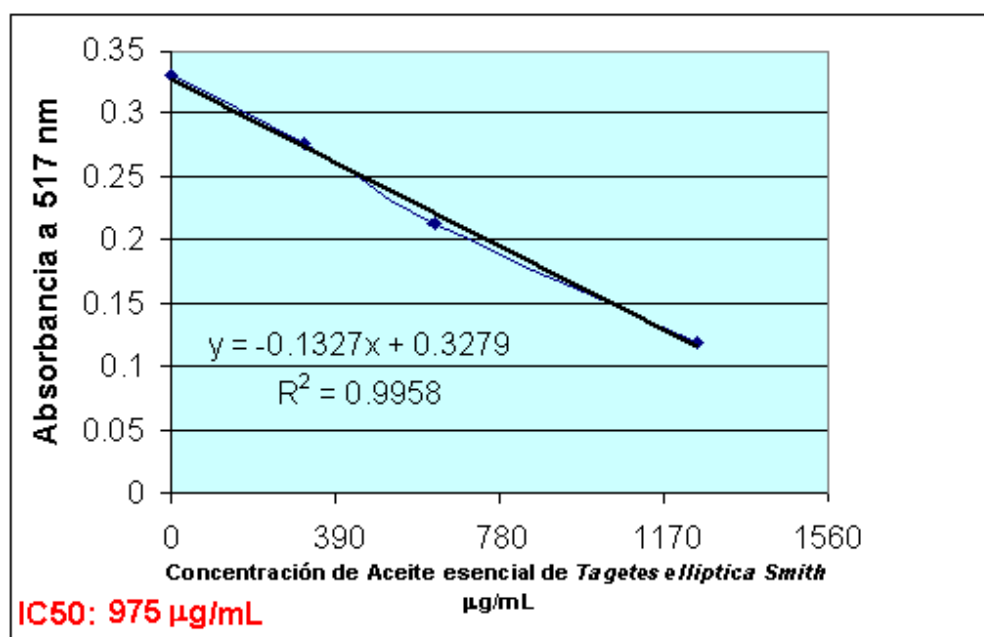


Figura 22. Curva de captación de DPPH del Aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith



### 3.4.2 Captación del radical superóxido producido por pirogalol:

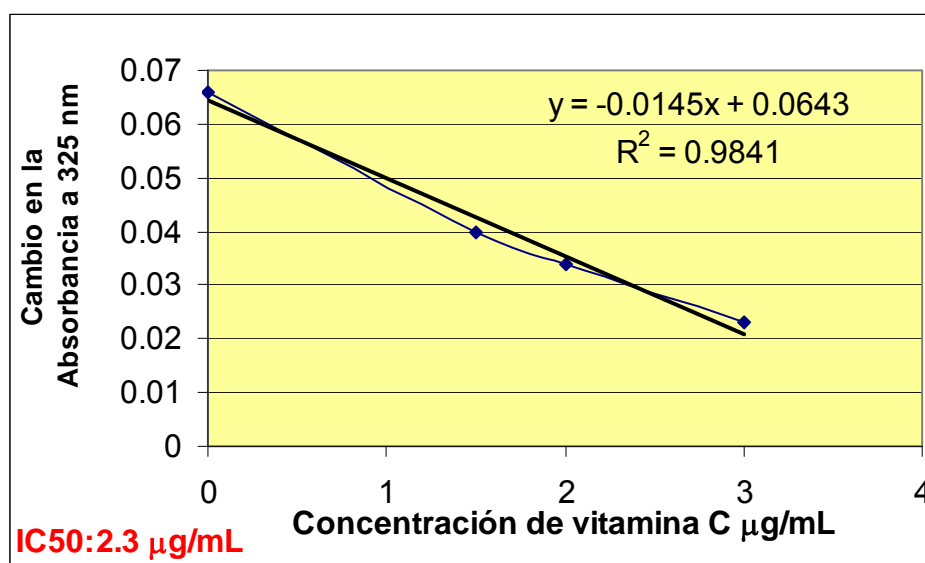


Figura 23. Curva de captación del radical superóxido producido por pirogalol de la vitamina C

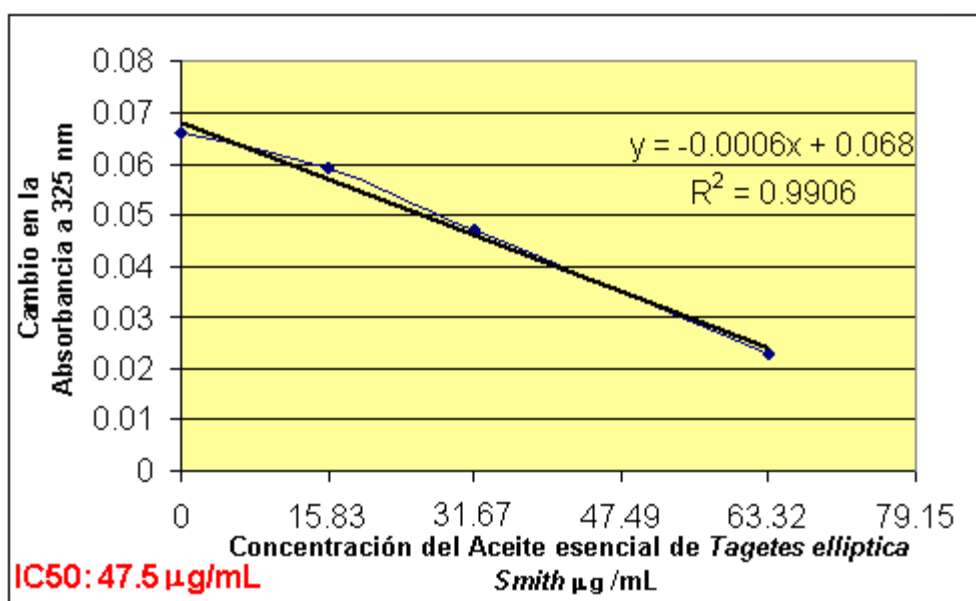


Figura 24. Curva de captación del radical superóxido del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith

## IV. DISCUSIÓN

Las características de un aceite esencial se determinaron a través de las pruebas de Densidad Relativa, Índice de Refracción, Rotación específica e Índice de acidez. (53)

La composición química cualitativa determinada por cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) en base a su tiempo de retención (RT) del aceite esencial, nos indica que está conformado por componentes con actividad biológica tipo  $\alpha$ -pineno y verbenona,  $\alpha$ -cadinol,  $\tau$ -cadineno, isocariofileno, forbol y ambrosina. Otros estudios publicados revelan similares resultados estableciendo que la composición química de los aceites esenciales están conformados principalmente por compuestos alifáticos, monoterpenos, sesquiterpenos con actividad biológica. (54, 55)

La actividad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith fue significativa con un halo de inhibición de  $65 \pm 15.56$  mm al 100%; mientras que en otros estudios como el de Alzamora y col., la actividad frente a *S. aureus* fue inferior, por ejemplo con *Tagetes pusilla* (6.0) , *Psiadia lithospermifolia* ( $20.8 \pm 0.2$ ), *Rosmarinum officinalis* ( $12.5 \pm 1$ ), *Ocimum sanctum* ( $10.3 \pm 0.5$ ). Con respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria, *Tagetes elliptica* Smith presenta actividad antibacteriana a CMI:  $< 7.62 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/mL}$ ; en otros estudios el CMI para *Staphylococcus aureus* presentó una actividad antibacteriana inferior en comparación con nuestro estudio por ejemplo en el caso de *Tagetes minuta* (25 $\mu\text{g/mL}$ ), *Apium graveolens* (1.0 v/v%), *Ocimum basilicum* (2.0 v/v%), *Pogostemon patchouli* (0.25 v/v%), *Rosmarinus officinalis* (1.0%v/v); mientras que para *Ocimum gratissimum* (0.75  $\mu\text{g/mL}$ ) el CMI presentó una actividad ligeramente superior en comparación a nuestro estudio. (15, 17, 47, 56, 57,58)

La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith con respecto a *S. aureus* se podría deber a la presencia de los compuestos: Isocariofileno, Verbenona y  $\alpha$ -Pineno, ya que los mismos son componentes principales de aceites esenciales que presentan actividad biológica. (25, 59, 60, 61, 62)

La actividad antibacteriana para *Staphylococcus epidermidis* del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith fue significativa con un halo de inhibición de 56 mm al 100%; mientras que en los estudios de Sarac y col., la actividad antibacteriana fue inferior, por ejemplo con *Thymbra spicata* (18 mm). En relación a la Concentración Mínima Inhibitoria el aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith presenta CMI: 0.125  $\mu$ L/mL (0.097 mg/mL); en otros estudios se encontró que para las especies *P. laxiflorus* (0.55 mg/mL) y *V. smithiana* (0.55 mg/mL) los valores del CMI evidenciaron una inferioridad respecto a nuestro estudio (63, 64). Esta actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith, con respecto a *S. epidermidis*, se podría deber a la presencia de los compuestos: Isocariofileno y  $\alpha$ -Pineno, ya que se ha reportado en otros estudios que los componentes mencionados presentan similar actividad biológica en comparación a nuestro estudio. (57, 62, 65)

Para *Bacillus subtilis*, la actividad del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith fue significativa, con un halo de inhibición de  $33.67 \pm 0.58$  mm; mientras que en otros estudios la actividad frente a *B. subtilis* fue inferior, por ejemplo: *Rosmarinus officinalis* ( $14.7 \pm 1$  mm), *Ocimum sanctum* (no presenta actividad), *Bidens tripartita* (11 mm). Con respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria el aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith presenta CMI: 390  $\mu$ g/mL; mientras que otros estudios presentan un CMI con una actividad inferior en comparación a nuestro estudio, por ejemplo *Pteronia incana* (1mg/mL), *Artemisia afra* (1mg/mL), *Rosmarinus officinalis* (1mg/mL), *Tagetes minuta* (1.5mg/mL), *Eriocephalus punchanlatus* (1mg/mL), *Ocimum basilicum* (1mg/mL) y *Bidens tripartita* (12.5 mg/mL); y en otros estudios el CMI presenta una actividad superior respecto a nuestro estudio por ejemplo: *Tagetes minuta* (12.5  $\mu$ g/mL) (15, 62, 66, 67). Esta actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith con respecto a *B. subtilis* se podría deber a la presencia del compuesto Isocariofileno, ya que otros estudios revelan que dicho compuesto presente en aceites esenciales muestra actividad antibacteriana. (25, 67)

Para *Escherichia coli*, la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith fue significativa, con un halo de inhibición de  $25 \pm 1.41$  mm; mientras que en otros estudios la actividad fue inferior a este estudio, por ejemplo con *Rosmarinus officinalis* ( $17.5 \pm 1$  mm), *Ocimum sanctum* ( $10.5 \pm 0.5$  mm), *Bidens tripartita* (no presenta actividad). En relación a la Concentración Mínima Inhibitoria *Tagetes elliptica* Smith presenta actividad antibacteriana a CMI:  $< 7.62 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/mL}$ , mientras que en otros estudios la actividad reportada fue inferior en comparación a este estudio como por ejemplo en el caso de *Tagetes minuta* (25  $\mu\text{g/mL}$ ), *Ocimum gratissimum* L. (6  $\mu\text{g/mL}$ ), *Apium graveolens* (2%v/v), *Ocimum basilicum* (0.5%v/v), *Pogostemon patchouli* (>2.0%v/v), *Rosmarinus officinalis* (>6.4 mg/mL) **(15, 47, 57, 58, 66)**. Esta actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith, con respecto a *E. coli*, se podría deber a la presencia de los compuestos: Isocariofileno, Verbenona y  $\alpha$ -Pineno; ya que se ha reportado en otros estudios que los componentes mencionados presentan actividad biológica. **(59, 60, 62, 68)**

Para *Pseudomonas aeruginosa*, la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith fue significativa, con un halo de inhibición de  $32 \pm 6.93$  mm; mientras que en otros estudios la actividad reportada fue inferior en comparación a este estudio como por ejemplo en el caso de *Rosmarinus officinalis* ( $23.4 \pm 0.2$  mm), *Ocimum sanctum* ( $8.23 \pm 0.5$  mm), *Bidens tripartita* (no presenta actividad). El aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith presentó CMI:  $< 7.62 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/mL}$ , mientras que en otros estudios la actividad reportada fue inferior en comparación a este estudio como por ejemplo en el caso de *Tagetes minuta* (50  $\mu\text{g/mL}$ ), *Bidens tripartita* (>100 mg/mL), *Apium graveolens* (>2.0%v/v), *Ocimum basilicum* (>2.0%v/v), *Pogostemon patchouli* (>2.0%v/v), *Rosmarinus officinalis* (>6.4mg/mL) **(15, 47, 57, 66)**. Esta actividad antibacteriana del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith con respecto a *P. aeruginosa* se podría deber a la presencia de los compuestos: Isocariofileno, Verbenona y  $\alpha$ -Pineno; ya que se ha reportado en otros estudios que los componentes mencionados presentan similar actividad antimicrobiana en comparación a nuestro estudio. **(25, 60, 61, 62)**

Para *Candida albicans* (levadura), la actividad antifúngica del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith fue significativa con un halo de inhibición de  $47.5 \pm 0.71$  mm; mientras que en otros estudios la actividad reportada fue inferior en comparación a este estudio como por ejemplo en el caso de *Tagetes pusilla* (20 mm), *Tagetes petula* (7.67 mm), *Lippia sidoides* (34 mm). Con respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria, *Tagetes elliptica* Smith presenta CMI: 780  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que en otros estudios la actividad reportada fue inferior en comparación a nuestro estudio como por ejemplo con *Tagetes petula* (3.1 mg/mL), *Apium graveolens* (1.0%v/v), *Lippia sidoides* (2.5 mg/mL), *Ocimum basilicum* (0.5%v/v), *Pogostemon patchouli* (0.5%v/v), *Rosmarinus officinalis* (1.0%v/v) (17, 47, 69, 70, 71). Esta actividad antifúngica del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith con respecto a *C. albicans* se podría deber a la presencia de los compuestos Isocariofileno y  $\alpha$ -Pineno; lo que es confirmado por otros estudios en los cuales se reportan que dichos componentes presentan actividad antifúngica. (61, 62, 72, 73)

El aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith presentó actividad antioxidante expresado en valores de IC<sub>50</sub>: 975  $\mu\text{g/mL}$ , y 54.8% de capacidad de captación del radical DPPH a 1248  $\mu\text{g/mL}$ ; los valores obtenidos fueron inferiores respecto al Trolox, usado como estándar, para el cual la actividad antioxidante alcanzó valores de IC<sub>50</sub>: 2.04  $\mu\text{g/mL}$  y 94.4% de capacidad de captación del radical DPPH a 3.6  $\mu\text{g/mL}$ . Mientras que en un estudio con el aceite esencial de *Origanum syriacum* L. Growing, este presentó  $17.12 \pm 1.21\%$  de capacidad de captación del radical DPPH a 500  $\mu\text{g/mL}$ . Dichos datos demuestran una eficacia antioxidante inferior en comparación con el estudio realizado al aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith. (25)

Asimismo en un estudio realizado con el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* blume (canela); éste presentó actividad antioxidante con valores de IC<sub>50</sub>: 0.245  $\mu\text{g/mL}$ , y % 94.42% de capacidad de captación del radical DPPH a 8.0  $\mu\text{g/mL}$ ; de igual manera el eugenol, un componente esencial del aceite de *Cinnamomum* presentó valores de IC<sub>50</sub> de 1.258  $\mu\text{g/mL}$ . Así mismo en un estudio con el aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray, presentó un

valor de IC50: 43.35  $\mu\text{g/mL}$ . En un estudio con el aceite esencial de *Jungia paniculata* DC Gray “Matico serrano”, presentó un valor de IC50: 13 $\mu\text{g/mL}$ . Igualmente en otro estudio con el aceite esencial de *Teucrium marum* (Lamiaceae), este presentó un valor de IC50:  $13.13 \pm 2.78 \mu\text{g/mL}$ . Los valores mencionados muestran su eficacia antioxidante superior en comparación al presente estudio **(28, 74, 75, 76)**.

El aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith “chincho” presentó actividad antioxidante expresado como IC50: 47.5  $\mu\text{g/mL}$ , y 65.15%% de capacidad de captación del radical superóxido producido por pirogalol a 62.4 $\mu\text{g/mL}$  los valores obtenidos fueron inferiores respecto a la vitamina C, usada como estándar; para la cual la actividad antioxidante presentó valores de IC50: 2.3 $\mu\text{g/mL}$  y 65.15% capacidad de captación del radical superóxido producido por pirogalol a 3  $\mu\text{g/mL}$ . Asimismo, en un estudio con extractos de *Pistacia lentiscus* y *Pistacia atlantica*, a una concentración de 62.5  $\mu\text{g/mL}$ , se reportaron valores de 14.2% y 19.3% de capacidad de captación del radical superóxido producido por pirogalol. Dichos datos demuestran una eficacia antioxidante inferior en comparación con el estudio realizado al aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith **(77)**.

## V. CONCLUSIONES

1.- Se obtuvo el aceite esencial de las hojas de *Tagetes elliptica* Smith “chincho” con un rendimiento del 0.49% (P/P).

2.- Los componentes químicos que se elucidaron del aceite esencial de las hojas de *Tagetes elliptica* Smith fueron: 2-Metil - 1 - butil acetato; 2(10) - Pineno, (1S, 5S)-(-)-; 1R -  $\alpha$  - Pineno; 4 - Etil - 4 metil - 1 - hexeno; 1 - Pentanol, 5 - (ciclopropil metileno) -; 3 - t - Butil - 6 - metil - 2H - pirano; l - Verbenona; Metoxicitronelal; Isocariofileno;  $\tau$  - Cadineno; Cadina - 3,9 - dieno;  $\alpha$  - Cadinol; Ácido ciclopropanocarboxílico, 2-metil-, 2,6 -di-t-butyl -4 - metilfenil éster; Forbol; Ambrosin y Butanimida.

3.- El aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith presentó actividad antibacteriana significativa frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25933 con un halo de inhibición de  $65 \pm 5.56$  mm, y CMI  $< 7.62 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/ml}$ ; *Staphylococcus epidermidis* (cepa clínica) con un halo de inhibición de 56 mm, y CMI=97.5  $\mu\text{g/ml}$ ; *Bacillus subtilis* (cepa ambiental) con un halo de inhibición de  $33.67 \pm 0.58$  mm, y CMI=390  $\mu\text{g/ml}$ ; *Escherichia coli* (cepa clínica) con un halo de inhibición de  $25 \pm 1.41$  mm, y CMI  $< 7.62 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/ml}$ ; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 con un halo de inhibición de  $32 \pm 6.93$  mm, y CMI  $< 7.62 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/ml}$ .

4.- El aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith presentó actividad antifúngica significativa frente a *Candida albicans* ATCC 10231 con un halo de inhibición de  $47.5 \pm 0.71$  mm y CMI 780  $\mu\text{g/ml}$ .

5.- El aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith no presentó actividad antioxidante significativa en comparación a las sustancias de referencia: Trolox y vitamina C.

## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con el estudio fotoquímico de las especies vegetales nativas de nuestra variada Flora.
- Continuar el trabajo de investigación del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith* para determinar otras propiedades biológicas.
- Continuar la investigación del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith* en otras cepas bacterianas y fúngicas.
- Determinar la actividad Tóxica del Aceite Esencial de *Tagetes elliptica Smith* In Vivo
- Realizar estudios de estabilidad y aplicativos a preparados galénicos (farmacéuticos) a base del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith*



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Pulgar V J. Geografía del Perú - Las ocho regiones naturales del Perú. Lima: Editorial Universo.; 1981.
- 2.- Sumaq Perú Travel SAC (Página principal en Internet) Lima; c2007 (citado 15 de febrero del 2009). Wiki Sumaq Perú; (aproximadamente 7 pantallas). Disponible en [http://wiki.sumaqperu.com/es/Parque\\_Nacional\\_Huascar%C3%A1n](http://wiki.sumaqperu.com/es/Parque_Nacional_Huascar%C3%A1n)
- 3.- Shiva RC. Estudio de la Actividad Antimicrobiana de Extractos Naturales y Ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento (tesis doctoral). Barcelona; Universitat Autònoma de Barcelona; 2007
- 4.- Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*. 2003; 10: 813-829
- 5.- Martínez J, Sulbarán de Ferrer B, Ojeda de Rodríguez G, Ferrer A, Nava R. Actividad Antibacteriana del Aceite esencial de mandarina. *Rev. Fac. Agron.* (Online) 2003 Oct.; 20 (4) (citado el 02 de Julio del 2008): 502-512. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182003000400010&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182003000400010&lng=es&nrm=iso)
- 6.- Contreras N, Martínez J, Stashenko E. Determinación de la Actividad Antioxidante In Vitro de los Aceites Volátiles de cuatro plantas de uso tradicional mediante la medición de la Peroxidación Lipídica de Aceite. *Scientia et Técnica*. 2006 Mayo; 30: 365-370.
- 7.- Eminagaoglu O, Tepe B, Yumrutas O, Akpulat A, Daferera D, Polissiou M, et al. The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss. and *Satureja cuneifolia* ten. *Food Chemistry*. 2007; 100: 339–343.
- 8.- Maguiña-Vargas C, Ugarte-Gil C, Montiel M. Uso adecuado y racional de los Antibióticos. *Acta Med. Per.* 2006; 23 (1):15-20.
- 9.- Bueno CM. Aditivos Antioxidantes (Monografía en Internet). BIOSALUD – Instituto de Medicina Biológica y Antienvjecimiento (citado el 30 de Julio del 2008). Disponible en: <http://www.biosalud.org/es/uploads/File/articulos/pdf116.pdf>
- 10.- Thorne R, Reveal J. An updated classification of the class Magnoliopsida ("Angiospermae"). 1era edición. The New York Botanical Garden (Nueva York): Enero: NYBG Press; 2007
- 11.- Tereschuk ML. Actividad biológica de flavonoides de Especies de *tagetes* más representativas del noroeste argentino (tesis doctoral). Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán; 2005

- 12.-** Ferreyra, R. Flora del Perú: Dicotiledóneas. Lima; 1986.
- 13.-** Murga-Gutiérrez SN. Nemátodos Fitoparásitos asociados al cultivo de *Tagetes erecta* en el distrito Virú, La Libertad, Perú. Neotrop. helminthol. 2007; 1(1): 15-20
- 14.-** Brack E A. Diccionario Enciclopédico plantas medicinales del Perú. Cuzco; 1999.
- 15.-** Senatore F, Napolitano F. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. Flavour Fragr. J. 2004; 19: 574–578
- 16.-** Pineda C, Camiloaga E, Zuñiga S. Actividad Antimicrobiana del extracto de hojas de Chincho (*Tagetes elliptica* L.) contra *Salmonella typhimurium* en cobayos (*Cavia porcellus* L.). Investigación Valdizana. 2007; 1 (1): 10-13
- 17.-** Alzamora L, Morales L, Armas L. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in Vitro de los Aceites esenciales. Anales de la facultad de Medicina. 2001; 62 (2) –156 – 161
- 18.-** Romagnoli C, Bruni C, Andreotti E. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. Protoplasma (2005) 225: 57–65
- 19.-** Universidad de Antioquía (página principal en Internet). Medellín; c 2009 (actualizado el 14 de febrero de 2009; citado el 18 de febrero de 2009) Udea Facultad de química farmacéutica (aproximadamente 2 pantallas); disponible en <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf>. //
- 20.-** Ortuño MF. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Primera edición. España: Aiyana ediciones; 2006.
- 21.-** Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra M J, Queraltó Compañó J M. Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Segunda edición; Volumen 1. Barcelona: editorial Reverté; 1998.
- 22.-** Costa J M. Diccionario de química física. Primera Edición. Barcelona: Ediciones Díaz de Santos; 2005.
- 23.-** Seymour RB, Carraher CE. Introducción a la química de los polímeros. Segunda reimpresión 2002. Barcelona: Editorial Reverte; 1996
- 24.-** Olsen ED. Métodos ópticos de análisis. Primera Edición. Barcelona: Editorial Reverté; 1990
- 25.-** McMurry J. Química Orgánica. Sexta edición. México DF: Thomson; 2005

**26.-** Millar DD, Sangines MC, Torre Marina M. Química de Alimentos: Manual de Laboratorio. Primera Edición. San José– Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 2003.

**27.-** McMurry J. Química orgánica. Sexta edición. México D.F. – México: Thomson Learning; 2005.

**28.-** Romero MD. Plantas Aromáticas: Tratado de Aromaterapia Científica. Primera Edición. Buenos Aires – Argentina: Editorial Kier

**29.-** Zekaria D. Los aceites esenciales, una alternativa a los Antimicrobianos. (Monografía en Internet) Laboratorios Calier; 2007 (Citado el 30 de Julio). Disponible en:  
[www.wpsa-aeca.com/img/informacion/wpsa1182855355a.pdf](http://www.wpsa-aeca.com/img/informacion/wpsa1182855355a.pdf)

**30.-** Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cubana Med Milit 2001;30(1):36-44

**31.-** Cascales Angosto M, Académica Numeraria de las Reales de Farmacia y Doctores. LA PARADOJA DE LA AEROBIOSSIS ¿Por qué es tóxico el oxígeno? (Conferencia); 26 de enero del 2005. Real Academia de Ciencias Veterinarias. Disponible en: <http://www.racve.es/actividades/detalle/id/326>

**32.-** Bello J. Ciencia Bromatológica, Principios generales de los alimentos. Madrid: Ediciones Díaz de Santos S. A.; 2000

**33.-** Hernández RM, Sastre GA. Tratado de nutrición. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 1999

**34.-** Cubero N, Monferrer A y Villalta J. Aditivos alimentarios: Colección Tecnología de los Alimentos. Madrid: Mundi-Prensa Libros; 2002

**35.-** Cheng Y, Prusoff WH (December 1973). "Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction". *Biochem Pharmacol* **22** (23): 3099–108.

**36.-** Puertas-Mejía M, Hillebrand S. In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. [Flavour and Fragrance Journal](#). 16 Apr 2002; **17**(5): 380 – 384

**37.-** Mehmet Hakki A, Ahmet M. Screening Chemical Composition and *in Vitro* Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils from *Origanum syriacum* L. Growing in Turkey. *B Biol. Pharm. Bull.* (2003); 26(12): 1725—1729

**38.-** Baik JS, Sang-Suk K. Chemical Composition and Biological activities of Essential Oils Extracted from Korean Endemic Citrus Species. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2008; 18(1): 74–79

- 39.-** Teixeira da Silva J. Mining the essential oils of the Anthemideae. African Journal of Biotechnology. 2004 December; 3 (12): 706-720,
- 40.-** Schmidt E, Jirovetz L, Buchbauer G and et al. Composition and Antioxidant Activities of the Essential Oil of Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) Leaves from Sri Lanka. Jeobp. 2006; 9 (2): 170 – 182
- 41.-** San Martín, R. Tratado de Farmacognosia. Primera Edición. Barcelona: Editorial Científico Médica; 1997.
- 42.-** Barquero Quirós M. Principios y aplicaciones de la cromatografía de gases. Primera. Edición. San Jose-Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 2006
- 43.-** González de Buitrago JM. Técnicas y métodos de laboratorio clínico. Segunda Edición. Barcelona : MASSON
- 44.-** Skoog DA. Principios de Análisis Instrumental. Sexta edición. México DF: Editorial Reverté; 2008.
- 45.-** Gamazo C, López-Goñi I, Díaz R. Manual práctico de Microbiología. Tercera Edición. Barcelona; Masson S. A.; 2005
- 46.-** Rojas R, Bustamante B, Bauer J, et al. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 2003; 88: 199–204
- 47.-** Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of Essentials oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology. 1999; **86**:985–990
- 48.-** Hongmei L, Xianjin W, Yizeng L, et al. Variation in Chemical Composition and Antibacterial Activities of essential oils from two species of *Houttuynia THUNB.* Chem. Pharm. Bull. 2006; 54(7): 936—940
- 49.-** Kuskoski EM, Asuero AG y Troncoso AM. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas. 2005 Oct- Dic; 25(4): 726-732.
- 50.-** Ugartondo Casadevall V. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares (Tesis de Doctorado). Barcelona: Universitat de Barcelona; 2009.
- 51.-** Marklund S. and Marklund G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. Eur.J. Biochem. 1974; 47: 469-474.
- 52.-** Mendoza HI, Yoldi T y Martínez G. Actividad Antioxidante del Clorhidrato de triacetona in Vitro. Rev. Cubana. Invest. Biomed. 2003; 22(2):81-9.

- 53.-** Fuertes Ruiton C. y Mungía Chipana Y. Estudio Comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (kunth) Griseb “Muña” de tres regiones peruanas por Cromatografía de gases y Espectrometría de masas.
- 54.-** Lock de Ugaz O. Investigación fotoquímica. Segunda Edición. Lima – Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
- 55.-** Gonzáles L, Villa A, Montes C. et al. Oxidación arílica de monoterpenos con metaloftalocianinas. *Scientia et Técnica*. 2007; 33: 111-115.
- 56.-** Govinden-Soulange J, Magan N, Gurib-Fakim A, et al. Chemical Composition and *in Vitro* Antimicrobial Activities of the Essential Oils from Endemic *Psiadia* Species Growing in Mauritius. *Biol. Pharm. Bull.* 2004 Nov ; 27(11): 1814—8
- 57.-** Seenivasan Prabuseenivasan, Manickkam Jayakumar y Savarimuthu Ignacimuthu. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2006; 6(39): 1 – 8
- 58.-** Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, Bando E, et al. Antibacterial Activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 1999 Sep./Oct.; 94(5): 675-678
- 59.-** Cha J-D, Eun-Kyung J, Bong-Seop K, et al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil from *Artemisia feddei*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007; 17(12): 2061–2065
- 60.-** Stojanovic G, Palic I, y Ursic-Jankovic J. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Micromeria cristata* and *Micromeria juliana*. *Flavour Fragr. J.* 2006; 21: 77–79
- 61.-** Unlu M, Vardar-Unlu G, Vural N, et al. Composition And Antimicrobial Activity Of *Juniperus Excelsa* Essential Oil. *Chemistry of Natural Compounds*. 2008; 44(1):129-131
- 62.-** Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, et al. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 1999; 29: 130–135
- 63.-** Sarac N, Ugur A, Duru E. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils of *Thymbra spicata* var. *intricata*. *International Journal of Green Pharmacy* 2008; 24-28
- 64.-** Vagionas K, Ngassapa O, Runyoro D, et al. Chemical analysis of edible aromatic plants growing in Tanzania. *Food Chemistry* 2007; 105: 1711-1717
-

- 65.-** Kim S-S, Baik JS, Oh T-H, et al. Biological Activities of Korean *Citrus obovoides* and *Citrus natsudaoidai* Essential Oils against Acne-inducing Bacteria. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2008; 72(10): 2507-2513
- 66.-** Tomczykowa M, Tomczyk M, Jakoniuk P et al. Antimicrobial and antifungal activities of the extracts and essential oils of *Bidens tripartite*. Folia Histochemica et cytobiologica. 2008; 46 (3): 389-393.
- 67.-** Oyedemi SO, Pirochenva G, Mabinya LV et al. Compositions and comparisons of some essential oils and antibiotics against selected bacteria. African Journal of Biotechnology 2008; 7(22): 4140-4146.
- 68.-** Cano Pérez, Carlos A. Actividad antimicótica in Vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minsthostachys mollis* “muña”. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
- 69.-** Dutta BK, Karmakar S, Naglot A, et al. Anticandidial activity of some essential oils of a mega biodiversity hotspot in India. Mycoses (2007), 50, 121–124
- 70.-** Fontenelle ROS, Morais SM, Brito EHS, et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2007) 59, 934–940
- 71.-** Botelho MA, Nogueira NAP, Bastos GM, et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2007) 40:349-356
- 72.-** Juteau F, Masotti V, Bessiereb JM, et al. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. Fitoterapia 73 (2002) 532–535
- 73.-** Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. Journal of Applied Microbiology 2003, 95, 853-860
- 74.-** Ricci D, Fraternale D, Giamperi L. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum*(Lamiaceae). Journal of Ethnopharmacology. 2005 ; 98 : 195-200.
- 75.-** Carhuapoma YM, Bonilla RP, Suárez CS, et al. Estudio de la Composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma Chequen* (Molina) “arrayán”. Ciencia e Investigación. 2005; 8(2): 73-79.
- 76.-** Béjar E, Suárez S. Antioxidant and gastroprotective *in vitro* properties of *Jungia paniculata* DC Gray “Matico serrano”. Havana Redox 2007, Abstract Book (64 de 105). 2007 January 25-27. Habana, Cuba.
- 77.-** Benhammou N, Atik Bekkara F y Kadifkova Panovska T. Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2008, April; 2(2): 22-28.
-



# **ANEXOS**





**1. Hojas de *Tagetes elliptica* Smith "Chincho"**



**2. *Tagetes elliptica* Smith "Chincho"**



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**



**CONSTANCIA N° 80-USM-2008**

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa) recibida de la Srta. **LESLIE SUAREZ DE LA CRUZ**, estudiante de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: ***Tagetes elíptica* Smith.**, y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE

GENERO: ***Tagetes***

ESPECIE: ***Tagetes elíptica* Smith.**


Nombre vulgar: "Chincho"

Determinada por: Mg. María I. La Torre A.

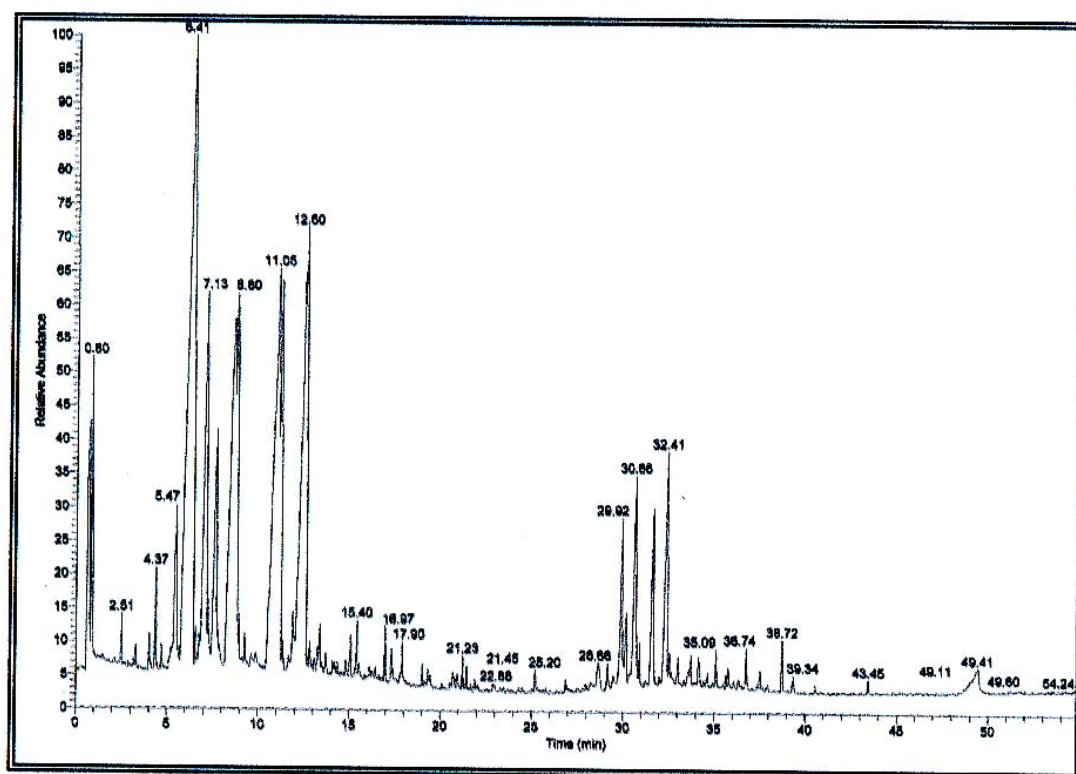
Se extiende la presente constancia a solicitud de la interesada, para fines de estudios

Lima, 15 de Julio de 2008.



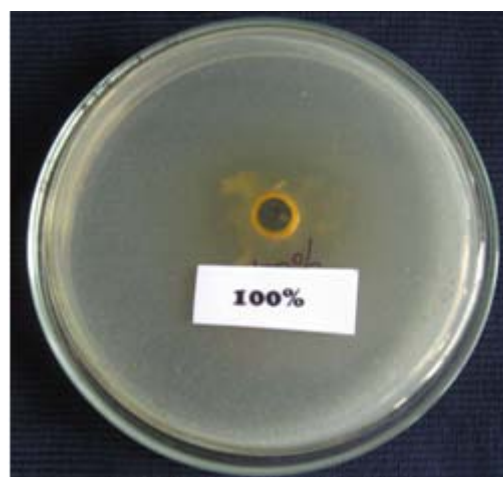
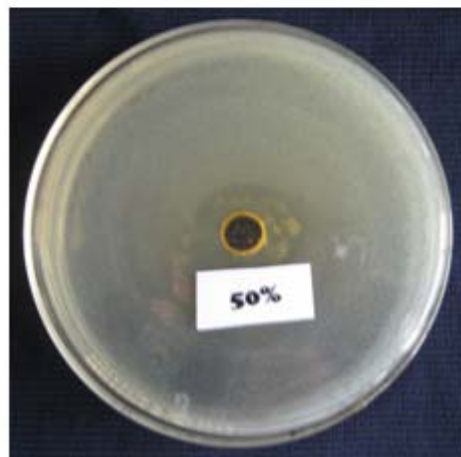
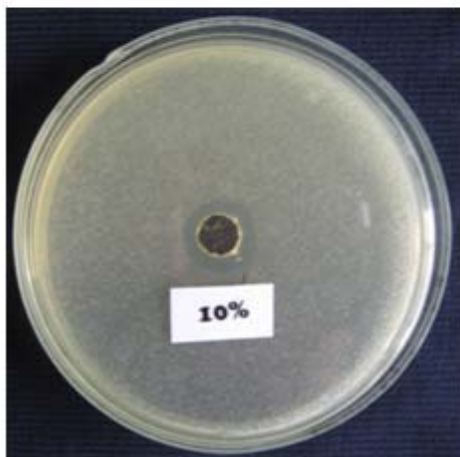
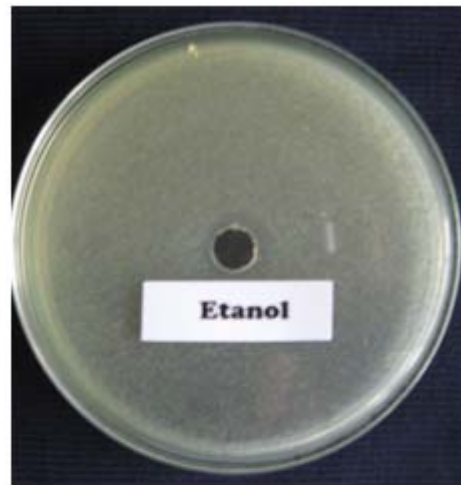
  
**Mg. Asunción Cano Echevarria**  
JEFE (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS  
(USM)

### 3. Cromatograma de Gas del Aceite Esencial de *Tagetes elliptica* Smith “Chincho”:

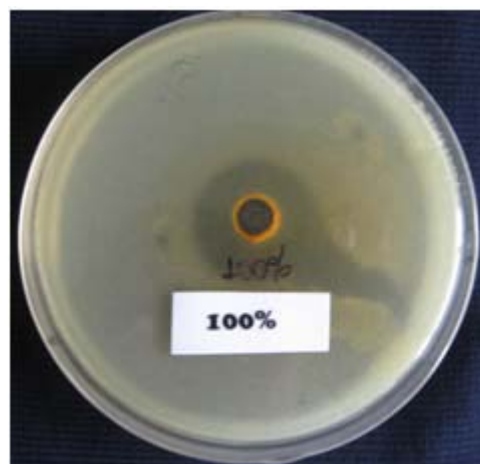
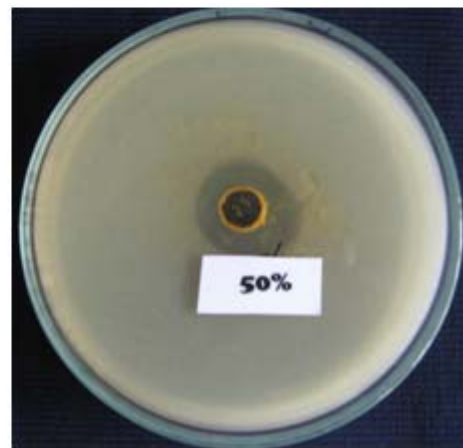
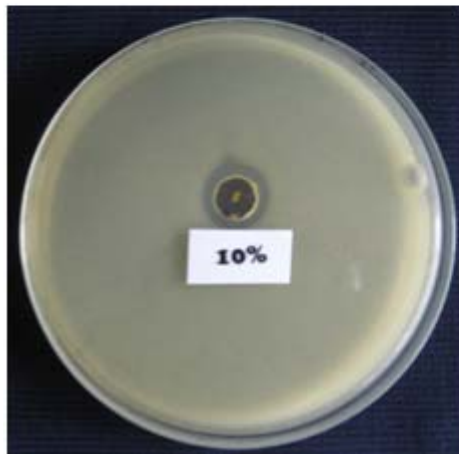
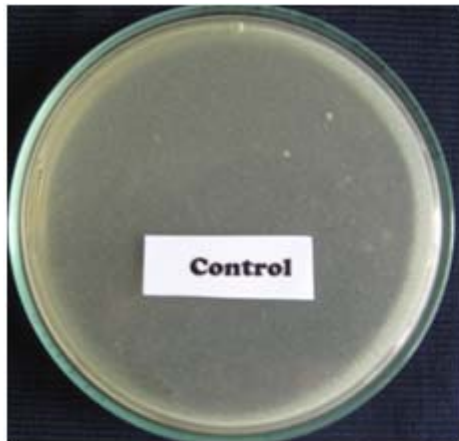




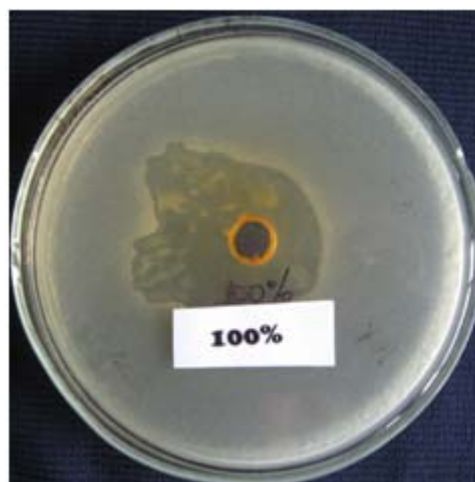
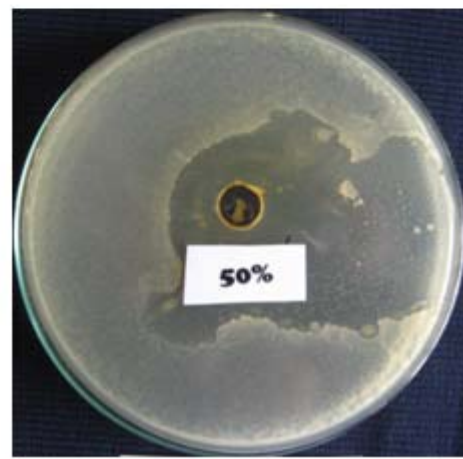
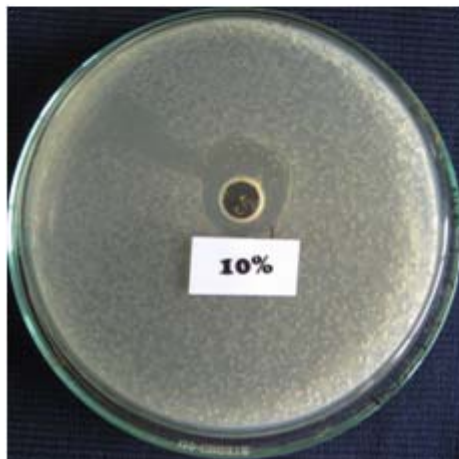
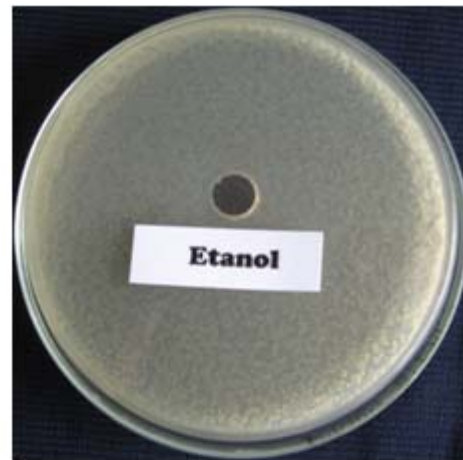
4. Actividad Antibacteriana de *Tagetes elliptica* Smith frente a *E. coli*.



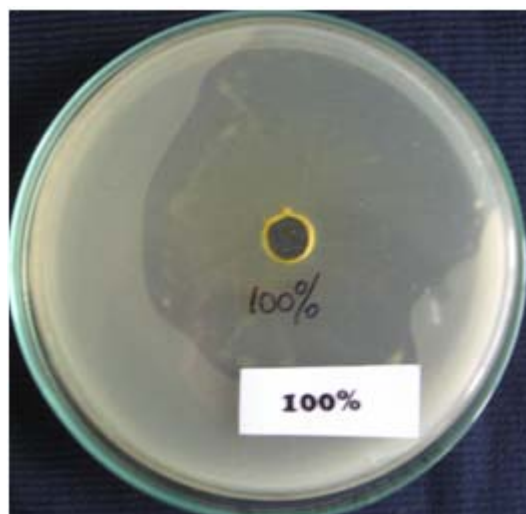
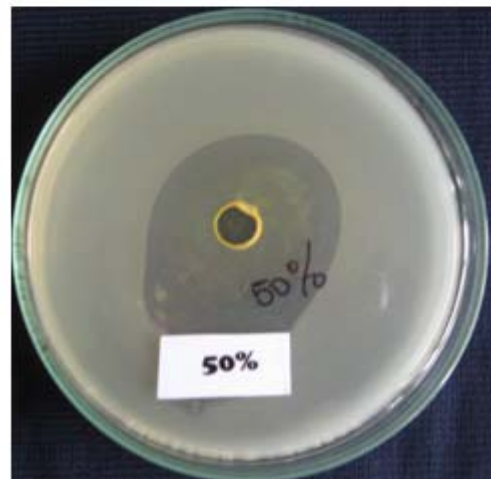
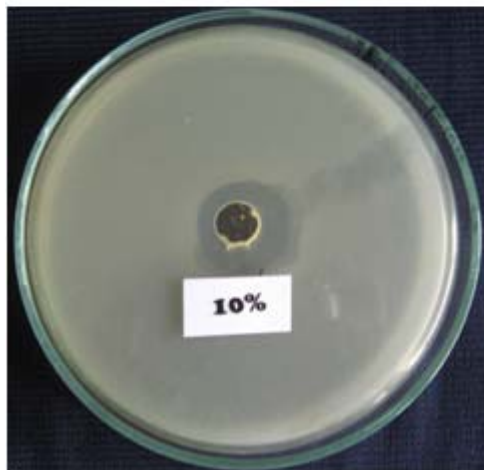
5. Actividad Antibacteriana de *Tagetes elliptica* Smith frente a *P. aeruginosa*.



6. Actividad Antibacteriana de *Tagetes elliptica* Smith frente a *B. subtilis*

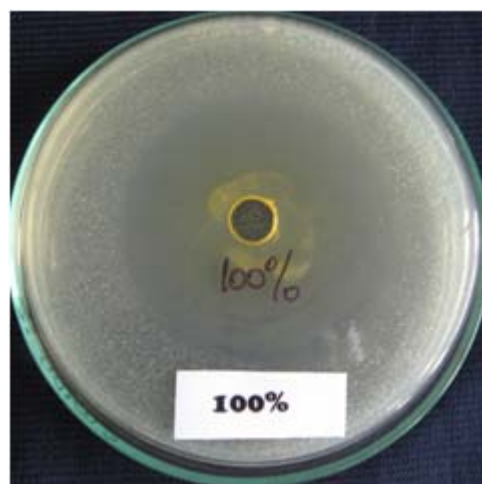
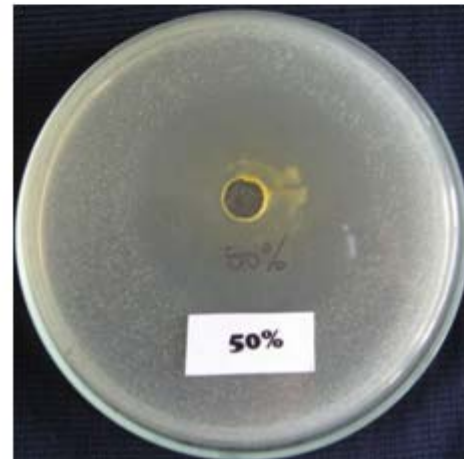
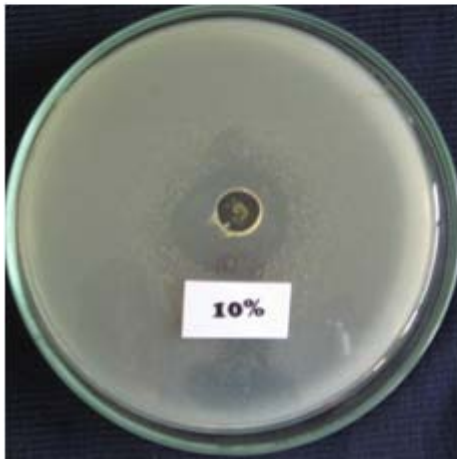
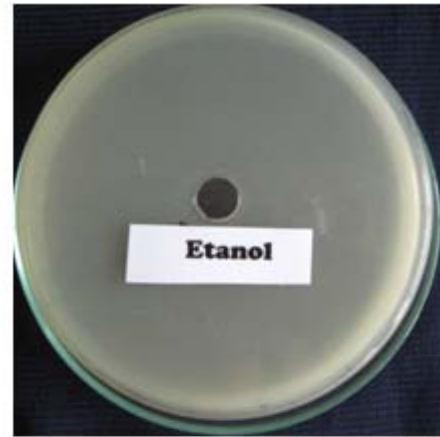


7. Actividad Antibacteriana de *Tagetes elliptica* Smith frente a *S. epidermidis*





8. Actividad Antibacteriana de *Tagetes elliptica* Smith frente a *S. aureus*





9. Actividad Antifúngica de *Tagetes elliptica* Smith frente a *C. albicans*

